

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

06.01.03

REC'D 03 MAR 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2001年12月28日

出願番号

Application Number:

特願2001-401689

[ST.10/C]:

[JP2001-401689]

出願人

Applicant(s):

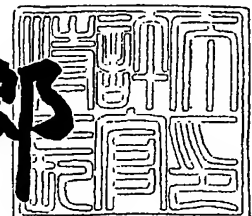
麒麟麦酒株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3006509

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01-0927

【提出日】 平成13年12月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 16/00

【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子-23に対する抗体

【請求項の数】 14

【発明者】

    【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

    【氏名】 山崎 雄司

【発明者】

    【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

    【氏名】 島田 孝志

【発明者】

    【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

    【氏名】 山下 武美

【特許出願人】

    【識別番号】 000253503

    【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

    【識別番号】 100118773

    【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100120134

【弁理士】

【氏名又は名称】 大森 規雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809317

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子-23に対する抗体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線維芽細胞増殖因子-23活性を有するポリペプチドを動物に免疫することによって得られ、リン酸代謝又はビタミンD代謝調節活性を有する抗体であって、以下の(a)、(b)又は(c)で示される抗体。

(a) 配列番号1に示す第180番目～第194番目若しくは第237番目～第251番目のアミノ酸配列を認識する抗体

(b) 受託番号がFERM BP-7838、FERM BP-7839若しくはFERM BP-7840であるハイブリドーマが生産する抗体

(c) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとの結合において、受託番号がFERM BP-7838、FERM BP-7839若しくはFERM BP-7840であるハイブリドーマが生産する抗体と競合する抗体

【請求項2】 モノクローナル抗体である請求項1記載の抗体

【請求項3】 受託番号がFERM BP-7838、FERM BP-7839又はFERM BP-7840であるハイブリドーマが生産する請求項1又は2記載の抗体。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項5】 腫瘍性骨軟化症、ADHR、XLH、腎性骨異栄養症、透析骨症、骨粗鬆症、低リン血症、クル病、骨軟化症、尿細管機能障害、骨減少症、低カルシウム血症、副甲状腺機能亢進症、異所性石灰化、掻痒、骨硬化症、パジェット病、高カルシウム血症、副甲状腺機能低下症、骨痛、筋力低下、骨格変形及び成長障害から選ばれる少なくとも1つの疾患に有効である、請求項4記載の医薬組成物。

【請求項6】 抗体が、配列番号1に示す第180番目～第194番目のアミノ酸配列を認識する抗体である請求項4記載の医薬組成物。



【請求項 7】 配列番号 1 に示す第25番目～第179番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体、及び配列番号 1 に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体を用いて被検試料と反応させることを特徴とする繊維芽細胞増殖因子-23の検出方法。

【請求項 8】 配列番号 1 に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体が、配列番号 1 に示す第180番目～第196番目のアミノ酸配列を認識する抗体である請求項 7 記載の検出方法。

【請求項 9】 更に、トロンビンインヒビターを用いる請求項 7 記載の検出方法。

【請求項 1 0】 配列番号 1 に示す第25番目～第179番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体、及び配列番号 1 に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体を含む、繊維芽細胞増殖因子-23の検出キット。

【請求項 1 1】 配列番号 1 に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体が、配列番号 1 に示す第180番目～第196番目のアミノ酸配列を認識する抗体である請求項 1 0 記載のキット。

【請求項 1 2】 請求項 1 ～ 3 に記載の抗体から選ばれる少なくとも一つの抗体を結合させた抗繊維芽細胞増殖因子-23抗体結合材。

【請求項 1 3】 請求項 1 2 記載の結合材を備えた医療器具。

【請求項 1 4】 血液中の繊維芽細胞増殖因子-23を除去するための請求項 1 3 記載の医療器具。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、線維芽細胞増殖因子-23 (FGF-23) に対する抗体に関する。

【 0 0 0 2 】

詳しくは、本発明は、生体内のFGF-23を適切に検出、測定することにより、FGF-23蛋白質の蓄積又は減少を伴う疾患や病的状態を診断する方法を提供するとともに、FGF-23が過剰に作用することで生じる疾患や病的状態において、FGF-23を抑制することにより病状の改善又は治療を可能とする抗体とその作製方法、使用

方法に関する。

【0003】

【従来の技術】

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor) は、最初に線維芽細胞株NIH3T3の増殖を刺激する物質としてウシの下垂体より精製された。以降、種々の組織より類似の蛋白質が同定されており、それら一群の物質はポリペプチドファミリー (FGFファミリー) を形成している。現在までのところ、FGFファミリーに属するものとして脊椎動物において22種の蛋白質が同定されている。これらの蛋白質の生物活性としては、線維芽細胞増殖活性だけでなく中胚葉や神経外胚葉の増殖や血管新生作用、発生段階における肢芽形成など多岐にわたる作用が知られている。FGFはその遺伝子の発現部位、発現時期についても多様であり、発生段階や成人における特定部位においてのみ発現しているというものも多い。FGFの受容体をコードする遺伝子としてはFGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4の少なくとも4種が知られており、またFGFR1、FGFR2、FGFR3においてはスプライシングの違いにより細胞外ドメインの異なる受容体蛋白質がそれぞれにおいて存在することが知られている。また、ヘパリンやヘパラン硫酸プロテオグリカンがFGFやFGF受容体と相互作用することにより作用を調節することが知られている。また、構造的類似性よりFGFファミリーに属するが、その生物活性や受容体結合性等について、ほとんど解明されていないものも多い。このようなFGFファミリーの特徴については、総説としてまとめられている (Ornitz, D. M. and Itoh, N. Fibroblast growth factors. *Genome biology* 2: 3005.1-3005.12, 2001)。

【0004】

FGF-23は、FGF-15との相同性を利用したデータベース検索とPCR法にて最初にマウスよりクローニングされ、さらにマウスFGF-23の配列相同性を利用してヒトFGF-23がクローニングされた (Yamashita, T., Yoshioka, M. and Itoh, N. Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 494-498, 2000)。続いて常染色体優性低リン血症性クル病・骨軟化症 (Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia

hia: 以下ADHRという)の研究において、ADHR患者における変異遺伝子領域を絞り込み、責任遺伝子の同定を進めるなかで、ADHR患者のFGF-23の遺伝子にミスセンス変異が特徴的に見出された(The ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. Nature Genet. 26: 345-348, 2000)。この発見により生体内における生理的重要性が強く示唆された。しかしながら、FGF-23の生物学的活性については依然不明であった。一方、FGF-23の生物活性を決定づけたのは腫瘍性骨軟化症の研究であった。この疾患では、疾患の責任腫瘍が液性の疾患惹起因子を分泌産生し、この疾患惹起因子の作用により低リン血症、骨軟化症等の病態に陥ることが考えられていた。この責任腫瘍が産生する疾患惹起因子の探索において、腫瘍に高発現する遺伝子としてFGF-23がクローニングされ、さらにこの因子を投与することにより、低リン血症や骨軟化症が再現されることが示された(Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R. Takeda, S, Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S and Yamashita, T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. Proc Natl. Acad. Sci. 98:6500-6505, 2001)。この研究により、FGF-23が生体内のリンやカルシウムに関連する代謝調節に関わることが示されるとともに、生体内を循環して作用を発現する全身性因子として作用することが示唆された。しかしながら、FGF-23の作用発現に必要な体内濃度や代謝については明らかではなく、また、FGF-23の生理的役割については不明な点が多い。また、臨床的所見において類似した様態を呈する疾患としてX染色体性低リン血症性クル病が知られているが、この病態におけるFGF-23の関与についてはこれまで明らかにされておらず、ADHRや腫瘍性骨軟化症以外にFGF-23が関連することが証明されている疾患はこれまでに知られていない。

#### 【0005】

前述の腫瘍性骨軟化症は、腫瘍形成に伴い血中リンと $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD(以下、 $1,25D$ という)が異常低値を示すことを特徴とし、筋力低下、骨軟化症を伴い時には、歩行障害、起立障害に至る。この疾患の責任腫瘍は間葉系細胞に由来する良性のことが多い。責任腫瘍の多くは増殖性に乏しく、経過観察

において著しい増大は認められず、また病態の進行が認められるものの責任腫瘍の発見に全身MRI検査等の精査を要する場合も少なくない。このことから、現在原因不明の低リン血症として確定診断が下されない症例においても腫瘍性骨軟化症が疑われるケースが存在している。腫瘍性骨軟化症の確定診断は、現在では腫瘍摘出手術により病状が回復することを確認する以外に方法がない。これは腫瘍形成と病状の因果関係を臨床検査により調べる方法が存在しないためであり、時には病状と全く関係のない非責任腫瘍の摘出手術に踏み切ってしまうケースもあり得る。このような状況を改善するためにも、腫瘍性骨軟化症を鑑別診断できる臨床検査方法の開発に期待が寄せられている。

## 【0006】

FGF-23が生体のリン代謝調節作用を有することが見出されてきたが、これまでリン代謝調節作用が知られている副甲状腺ホルモンや1,25Dは、リン代謝調節よりもむしろカルシウム代謝調節において重要な役割を果たしている。リン代謝を中心に調節する分子はこれまで知られておらず、FGF-23にそのような活性が期待されている。一方で、リン代謝とカルシウム代謝が密接に関連することは、臨床学的に知られているところであり、特に骨組織の石灰化や病的な異所性の石灰化を考える上で切り離して考えることは困難である。FGF-23の過剰な状態が骨軟化症を導くことや、1,25Dを低下させる作用を有していることから、FGF-23がリン代謝だけでなく石灰化の調節や骨代謝に広く関わっていることが考えられ、腸管、腎臓、骨組織を中心としたミネラル代謝調節器官の異常疾患においてFGF-23の過剰蓄積や欠乏状態を伴うものが存在する可能性が考えられる。このような疾患を理解し、的確に治療を施すためにもFGF-23の体内濃度を検査する方法の開発が望まれる。

## 【0007】

FGF-23の過剰が疾患を引き起こす病態において、FGF-23を抑制あるいは除去することが疾患の治療方法となりうるということが考えられる。考えられる一つの方法としては、FGF-23の受容体拮抗物質やFGF-23結合物質によるリガンド-受容体相互作用の阻害やFGF-23結合物質を用いたFGF-23の除去が考えられる。しかしながら、上記のような方法でFGF-23を選択的に抑制あるいは除去する物質は知られてい

ない。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、FGF-23を認識する抗体、並びに該抗体を用いてFGF-23が関連する疾患の診断方法、治療方法及び予防方法を提供することを目的とする。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、FGF-23蛋白質の部分的構造を特異的に認識して結合する抗体を得、さらに該抗体を用いてFGF-23を検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線維芽細胞増殖因子-23活性を有するポリペプチドを動物に免疫することによって得られ、リン酸代謝又はビタミンD代謝調節活性を有する抗体であって、以下の(a)、(b)又は(c)で示される抗体。

【 0 0 1 1 】

(a) 配列番号1に示す第180番目～第194番目若しくは第237番目～第251番目のアミノ酸配列を認識する抗体

(b) 受託番号がFERM BP-7838、FERM BP-7839若しくはFERM BP-7840であるハイブリドーマが生産する抗体

(c) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとの結合において、受託番号がFERM BP-7838、FERM BP-7839若しくはFERM BP-7840であるハイブリドーマが生産する抗体と競合する抗体 (2) 前記抗体を有効成分として含む医薬組成物。本発明の医薬組成物には、配列番号1に示す第180番目～第194番目のアミノ酸配列を認識する抗体が含まれる。本発明の組成物は、腫瘍性骨軟化症、ADHR、XLH、腎性骨異常栄養症、透析骨症、骨粗鬆症、低リン血症、クル病、骨

軟化症、尿細管機能障害、骨減少症、低カルシウム血症、副甲状腺機能亢進症、異所性石灰化、掻痒、骨硬化症、パジェット病、高カルシウム血症、副甲状腺機能低下症、骨痛、筋力低下、骨格変形及び成長障害から選ばれる少なくとも1つの疾患に有効であり、これらの疾患の治療又は予防に使用することができる。

【 0 0 1 2 】

(3) 配列番号1に示す第25番目～第179番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体、及び配列番号1に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体を用いて被検試料と反応させることを特徴とする繊維芽細胞増殖因子-23の検出方法。

【 0 0 1 3 】

上記検出方法において使用される抗体（配列番号1に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体）としては、例えば配列番号1に示す第180番目～第196番目のアミノ酸配列を認識する抗体が挙げられる。また、本発明の検出方法には、更に、トロンビンインヒビターを用いることもできる。

【 0 0 1 4 】

(4) 配列番号1に示す第25番目～第179番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体、及び配列番号1に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体を含む、繊維芽細胞増殖因子-23の検出キット。

【 0 0 1 5 】

本発明のキットには、配列番号1に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体として、配列番号1に示す第180番目～第196番目のアミノ酸配列を認識する抗体が含まれる。

【 0 0 1 6 】

(5) 前記抗体から選ばれる少なくとも一つの抗体を結合させた抗繊維芽細胞増殖因子-23抗体結合材。

【 0 0 1 7 】

(6) 前記結合材を備えた医療器具。本発明の医療器具は、血液中の繊維芽細胞増殖因子-23を除去するために使用される。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0018】

## 【発明の実施の形態】

FGF-23は腫瘍性骨軟化症の責任腫瘍において高発現していることが知られており、実験的にFGF-23を分泌する細胞をヌードマウスに移植することで腫瘍性骨軟化症の特徴である低リン血症、骨軟化症が再現されることから、腫瘍性骨軟化症の誘発因子であると考えられる。一方で遺伝性低リン血症の一つの様態である常染色体遺伝性低リン血症性クル病 (ADHR: autosomal dominant hypophosphatemic rickets) の責任遺伝子の探索研究が進められ、ADHR患者において特異的に変異が認められる遺伝子としてFGF-23が同定されている。これらのことからFGF-23が低リン血症性疾患の病原性因子として関与していることが考えられる。FGF-23の生物活性については組換え体FGF-23をマウスに投与する実験において、低リン血症を誘導することが確認されている。これらのことから、FGF-23は生体内で液性因子として作用してリン代謝や骨代謝を調節していることが推察される。従って、体内のFGF-23を定量的および定性的に評価することは、疾患の理解、診断に非常に有用である。また、FGF-23の生物活性を調節することにより、先に述べたFGF-23の関与が明らかな低リン血症性疾患を治療できることが期待されるだけでなく、リン代謝や骨代謝の制御を可能とし、ミネラル代謝異常や代謝性骨疾患などの治療への応用も考えられる。

【0019】

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

【0020】

本願明細書または図面においてアミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの一文字は、各々次に示すアミノ酸を意味する。(G) グリシン、(A) アラニン、(V) バリン、(L) ロイシン、(I) イソロイシン、(S) セリン、(T) スレオニン、(D) アスパラギン酸、(E) グルタミン酸、(N) アスパラギン、(Q) グルタミン、(K) リジン、(R) アルギニン、(C) システイン、(M) メチオニン、(F) フェニルアラニン、(Y) チロシン、(W) トリプトファン、(H) ヒスチジン、(P) プロリン。またDNAを表記するために用いられるアルフ

アベットの一文字の意味は、各々次に示す。(A) アデニン、(C) シトシン、(G) グアニン、(T) チミン。

#### 【 0 0 2 1 】

リン酸調節活性とは、血中のリン酸濃度を調節する活性を指す。

ビタミンD代謝調節活性とは、生体内に存在するビタミンDおよびそれにより体内にて合成される代謝物の絶対量の変化、又は存在率の変化を調節する効力を指す。

#### 【 0 0 2 2 】

##### 1. FGF-23を認識する抗体

本発明でいうヒトFGF-23とは、後述するアミノ酸配列（配列番号1）を有するポリペプチドのことであり、また前述に例示したような特徴（活性）を有するものである。さらに、本発明におけるFGF-23及びその一部には、後述する本願発明の抗体が反応性を有する限りにおいて、その天然型のタンパク一次構造と実質的に同一のアミノ酸配列を有するヒトFGF-23誘導体及びその一部も包含される。

#### 【 0 0 2 3 】

ここで実質的に同一のアミノ酸配列を有するヒトFGF-23誘導体なる用語は、天然型のヒトFGF-23と実質的に同等の性質（活性）を有する限り、そのアミノ酸配列中の1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失及び、または修飾されているアミノ酸配列を有するタンパク質を意味する。さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加が複数の組み合わせの場合であってもよい。ヒトFGF-23の活性とは、前記と同様低リン血症又は骨軟化症を誘発し得る活性を意味する。

#### 【 0 0 2 4 】

本発明におけるヒトFGF-23は、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような技術的分野において知られる公知の方法又はその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。またヒトFGF-23の部分配列は、後述する技術的分野において知られる公知の方法又はその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離したヒトFGF-23をタンパク分解酵素等を用いて適切に切断することにより製造することができる。



## 【0025】

本発明における抗体とは、前記に定義したようなヒトFGF-23またはその一部に反応性を有する抗体あるいは抗体の一部である。本発明の抗体には、抗体を構成する重鎖及び／または軽鎖の各々のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び／または軽鎖からなり、FGF-23と結合し得るモノクローナル抗体も包含される。本発明のヒトFGF-23または抗体のアミノ酸配列中に、前記のようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。これらの改変技術は当業者に周知であり、市販の突然変異導入キット等を使用することができる。

## 【0026】

## (1) FGF-23蛋白質の部分的構造を特異的に認識して結合する抗体

FGF-23の検出や生物活性の調節に有用な抗体を取得するには、FGF-23の構造的特徴を認識する抗体、高親和性を有する抗体、生物活性を中和できる抗体などの取得が有効である。FGF-23の構造や抗原性については不明であるので、FGF-23の部分配列に相当する複数のペプチドを合成して、各ペプチドに対する抗体の取得を行った。これらを用いて発現細胞が分泌したFGF-23の検出をウェスタンブロッティングにより行ない、発現細胞の培養上清中には成熟型FGF-23蛋白質の他に多量のFGF-23蛋白に由来する低分子量のペプチドが含まれていることを明らかにした。また、得られた抗体は成熟型FGF-23とその切断により生じるペプチドに対して多様な結合特異性を示した。さらに、免疫沈降法により、抗体の液相での結合活性を明らかにした。さらに、これらの部位特異的抗体を組み合わせることで、多様なFGF-23由来ペプチドの中から特定の配列領域を持つペプチドを検出することを可能にした。FGF-23の修飾、代謝に関する詳細は明らかにされていないが、我々はFGF-23をCHO細胞で発現させた場合にシグナル配列を消失した全長蛋白質だけでなく、179番目のArg残基と180番目のSer残基の間で切断に基づく代謝物の存在を本発明で得た種々の抗体を用いた検出実験で明らかにした。さらに、FGF-23を含む血液サンプルを血漿および血清として採取して代謝物を検出する実験、および精製組換え体と血清との混和実験により、血漿中ではFGF-23は全

長型で存在するのに対して、血清中ではFGF-23の196番目Arg残基と197番目のAla残基の間で切断が生じることを明らかにした。これはThrombinによるものと考えられ、198番目のArgと199番目のMetの間でも切断が生じていることが考えられる。

#### 【0027】

##### (2) 抗体の製造

本発明の抗体は、例えば、下記のような製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前記で定義したようなヒトFGF-23又はその一部、あるいは抗原の抗原性を高めるための適当な物質（例えば、bovine serum albumin等）との結合物を、必要に応じて免疫賦活剤（Freund's Adjuvant等）とともに、ヒト抗体産生トランスジェニックマウス等を含む非ヒト哺乳動物に免疫する。あるいは、FGF-23を組み込んだ発現ベクターを投与することにより免疫感作を行うことができる。ポリクローナル抗体は、免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、ハイブリドーマをクローン化し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

#### 【0028】

さらに具体的には下記のようにして製造することができる。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature, 1975 Vol.256:495-497）及びそれに準じて行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓又は扁桃等、好ましくはリンパ節または脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェル中の培養上清の免疫抗原に対する反応性を、例えばELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

## 【 0 0 2 9 】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養して培養上清から単離することができる。また、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の腹水中等でのインビボで培養し、腹水から単離することもできる。

## 【 0 0 3 0 】

また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換型抗体を調製することができる（P.J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、そのトランスジェニック動物のミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

## 【 0 0 3 1 】

本発明のポリクローナル抗体は、実施例5に示すように、化学合成したFGF-23の部分ペプチドとキャリア蛋白質であるウシサイログロブリンと結合させたものを作製し、ウサギを免疫した。免疫により誘導された各ペプチドに対する抗体は、免疫に用いたペプチドを固相化したアフィニティーカラムで精製した。このようにして得た抗体の特性については、ウェスタンブロッティングとELISAにて検討しFGF-23蛋白質に対する反応性を明らかにした。

## 【 0 0 3 2 】

本発明のモノクローナル抗体の作製は、実施例3に示した2つの方法で免疫し、得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の特性として、実施例9に示す固相化したFGF-23部分ペプチドとの反応性や実施例10に示す免疫沈降実験でのFGF-23蛋白質との反応性を調べ、各抗体とFGF-23との結合特性や認識部位の特異性について明らかにした。

## 【 0 0 3 3 】

## 2. FGF-23の検出方法

## (1) 生体試料中のFGF-23とその代謝物を区別して定量的に検出する方法

臨床検査において生体試料中の活性を有するFGF-23を的確に測定する必要があるが、我々が見出したFGF-23の産生時に生じるFGF-23蛋白切断や血液サンプル調製におけるFGF-23の蛋白切断による断片化産物がFGF-23の測定の妨害因子となることが考えられる。特に、我々は配列番号1に示す第179番目と180番目の間の切断で活性が消失することを明らかにしている。従って、生体試料中の活性を有するFGF-23を検出するためには、配列番号1に示す第25番目～第179番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体と、配列番号1に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体とを組み合わせたサンドイッチELISA法が有効であり、我々が取得したN末側認識抗体である2C3B抗体と、C末側認識抗体である3C1E抗体または1D6A抗体とを組み合わせることで実施できる（図5）。さらには、血液サンプルの調製においても血清サンプルを用いた場合に血中に存在する全長FGF-23が196番目と197番目、あるいは198番目と199番目との間で切断されることがあることから、この場合では197番目以降のC末側を認識する抗体を用いた場合に本来の血中存在量を反映する測定が不能となる。この切断は血漿中では観察されない（実施例26）、血清サンプルを用いた場合でも、我々が取得した180番目から196番目の間を認識する抗体である3C1E抗体をC末認識抗体として用いることで本来の血中存在量を反映する測定が可能となる。

## 【 0 0 3 4 】

また血清サンプルの調製の際に、FGF-23を切断する酵素はトロンビンであることが明らかになった（実施例17）。従って、トロンビンインヒビターを血清サ

ンプル調製の際加えることによって血清サンプル調製に伴うFGF-23の主たる切断を抑制し、検出におけるFGF-23の切断による影響を回避することも可能である。トロンビンインヒビターとしては、FGF-23の検出を妨げないものであれば何でも良く、好ましくはヒルジンがあげられる。

## 【0035】

また本願は、配列番号1に示す第25番目～第179番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体、及び配列番号1に示す第180番目～第251番目のアミノ酸配列の一部を認識する抗体を含む、FGF-23の検出キットに関する。本出願のFGF-23の検出キットにおいて、抗FGF-23抗体の他、安定剤、pH調整剤等を必要に応じて含有させることができる。

## 【0036】

## (2) FGF-23を高感度に検出する方法

FGF-23の生体での作用と病態との関連を明らかにすることは臨床上有用であり、腫瘍性骨軟化症の鑑別診断や遺伝性低リン血症性クル病 (ADHR, XLH: X-linked hypophosphatemic rickets) の診断において有用である。栄養不良および家族歴が認められない低リン血症、クル病、骨軟化症については病因が特定できない疾患として診断が困難であるのが現状である。このような患者においてFGF-23の血中濃度上昇が認められた場合、遺伝子変異の確認による遺伝性疾患の鑑別診断や精緻な腫瘍検出法を応用して腫瘍を発見することにより腫瘍性骨軟化症の治療を可能にするなどの治療指針を導くことができるようになる。また、FGF-23がリン代謝調節因子、ビタミンD代謝調節因子として深く生体機能に関与している可能性から、ミネラル代謝異常を伴う疾患、腎機能疾患、骨代謝疾患などの病態において血中濃度が変動していることが考えられ、健常人の平均的なFGF-23の血中濃度と、これら疾患患者のFGF-23血中濃度とを比較することで、病態の理解、治療方法の選択や治療方針の決定に有用であることが考えられる。このような、FGF-23の検出系を構築する上で、血中のFGF-23濃度が測定可能な検出感度が求められる。我々は取得した抗体の種々の組み合わせをサンドイッチELISA法で検討し、健常人および疾患患者におけるFGF-23の血中濃度を定量的に測定することを可能にした。

## 【 0 0 3 7 】

抗体を活用して抗体が認識する物質（抗原分子という）を検出する方法としては、抗体と抗原分子との結合を利用して検出可能量の基質を回収する方法、検出対象の抗原分子に特異的に結合した抗体を検出することで抗原分子の存在を検出する方法、既知量の基質と抗体との特異的結合において、検出対象の抗原分子を存在させることで生じる競合を測定することで抗原分子の存在を検出する方法などがある。これらを活用して定性的な検出方法としては、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、免疫染色などがあり、さらに定量的に測定する方法としては、ラジオイムノアッセイ、ELISA、FACSなどの方法が一般的に知られている。また、抗体が認識する抗原分子が修飾や切断を受け多様な形態を呈し、その一部の形態のものを特定して検出する方法としては、対象物質の異なる部位を認識する抗体を組み合わせることが有効であり、代表例としてサンドイッチELISAがある。

## 【 0 0 3 8 】

本発明のFGF-23の検出方法を完成するにあたり、FGF-23には蛋白切断に起因する複数の分子種の存在が図1Aで明らかである。特に、実施例16に示すように血中で全長として存在するFGF-23が血清中で切断されることが明らかとなり、生体内でのFGF-23を的確に定量的に検出するためにはこのような切断を考慮した検出系の開発が必要であった。これには上述のFGF-23蛋白質の部分配列を認識する抗体を組み合わせる用いることが非常に有用であった。ポリクローナル抗体を用いたELISAについては、実施例7に示すようにFGF-23蛋白質とその切断断片を選択的に測定することができることを示した。また、実施例3、実施例4で取得した抗FGF-23モノクローナル抗体についても、FGF-23蛋白質の認識部位の特異性が解析されており、またFGF-23との結合特性からサンドイッチELISAへの応用が可能であることを明らかにした。取得した抗体のうち、1D6A抗体、2C3B抗体、3C1E抗体は、それぞれ固相化抗体としても検出抗体としても用いることができることが判明した。一方、2A2B抗体はいずれの用途にも不適であった。また、FGF-23蛋白質の蛋白切断が生体内および血清調製時に生じることが明らかとなった。配列番号1に示したFGF-23蛋白質のアミノ酸の25番目～179番目までの配列領域、180番目～19

6番目までの配列領域、197番目～251番目までの配列領域をそれぞれ認識する抗体を組み合わせることで、FGF-23蛋白質の代謝物の検出、測定を実現できる。本発明の抗体のなかで、2C3B抗体は配列番号1に示したFGF-23蛋白質のアミノ酸の25番目～179番目までの配列領域を認識する抗体であり、3C1E抗体は180番目～196番目までの配列領域を認識する。1D6A抗体は、配列番号1の237番目～251番目の配列領域を認識する抗体であった。特に臨床検査等の目的で活性を有するFGF-23蛋白質の検出を考えた場合に血清調製時生じるような切断も考慮して、25番目～179番目までの配列領域を認識する抗体と、180番目～196番目までの配列領域を認識する抗体とを組み合わせることが好ましく、特に、2C3B抗体を固相化抗体として用い、3C1E抗体を検出抗体として用いることで高感度の検出系を実現している。また、全長のFGF-23蛋白質を検出する上では、25番目～179番目までの配列領域を認識する抗体と、237番目～251番目までの配列領域を認識する抗体とを組み合わせることが好ましく、特に、2C3B抗体を固相化抗体として用い、1D6A抗体を検出抗体として用いることで高感度の検出系を実現している。

### 【 0 0 3 9 】

#### 3. 低リン血症性疾患、クル病、骨軟化症の診断方法

ADHRの患者においてFGF-23遺伝子のミスセンス変異が低リン血症性疾患の惹起に参与していることが示唆された (The ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genet.* 26: 345-348, 2000)。さらに我々は腫瘍性骨軟化症において腫瘍が産生する疾患惹起因子としてFGF-23を同定した (Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R. Takeda, S, Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S and Yamashita, T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl. Acad. Sci.* 98:6500-6505, 2001)。これらの研究により、FGF-23が低リン血症性疾患やクル病・骨軟化症を伴う疾患に参与している可能性がある。しかし、これまで生体内のFGF-23を定量的に解析する方法がなかった。本発明において、我々は上述のようにFGF-23の特異的検出系を確立した。これを用いて実施例19に示すように、腫瘍性骨軟化症患者より腫瘍摘出前に採取した血液サンプルと腫瘍摘出後の血液サンプルに

含まれるFGF-23を定量的に測定した。図14Bに示すように手術前では血中FGF-23は著しい高値を示したが、腫瘍摘出後の血中FGF-23濃度は検出限界付近まで低下していた。腫瘍性骨軟化症では、一般に腫瘍は小さく、低リン血症、筋力低下、骨痛、骨軟化症等の症状を呈するにも関わらず、原因腫瘍が見つからない場合がある。また、腫瘍が認められた場合においても、腫瘍がFGF-23を産生していることを確認出来ないため、類似の症状を示す低リン血症疾患との鑑別診断が困難である。本発明の測定は、腫瘍性骨軟化症疾患における血中FGF-23の上昇レベルを検出することを可能とするものであり、従来不可能であった診断を可能にするものである。

## 【0040】

遺伝性低リン血症のなかで最も罹患率の高い疾患であるXLHは約2万人に1人の割合で存在するといわれている。XLHの責任遺伝子はPHEXとして同定されているが、本遺伝子は22個のエクソンからなり、その遺伝子領域は220kbにわたるため遺伝病の原因となる変異解析は現在のところ診断目的では不可能な状況である。突発的発症例や成人発症型の存在も示唆されている。これまでのところPHEXとFGF-23の関連は明らかにされていない。XLHのモデル動物として自然発症変異マウスであるHypマウスが知られている。このマウスではPHEX遺伝子の3'領域の欠損が確認されており、低リン血症、クル病・骨軟化症を呈することが知られている。本発明の測定系を用いて、実施例23に示すように、我々はHypマウスにおけるFGF-23の血中濃度の測定を行い、FGF-23の濃度が著しく高いことを見出した。これらのことから、本発明の抗体およびそれを用いた検出法や測定法が腫瘍性骨軟化症、XLHの診断を可能にするものである事が明らかとなった。さらには他の低リン血症疾患でFGF-23の変異が原因とされるADHRにおいても本発明の測定法は活用できると考えられる。

## 【0041】

FGF-23は、血中のリン濃度と1,25D濃度を低下させる活性を有しているが、その生理的役割についてはよく解明されていない。後述するFGF-23活性の中和実験により、我々はFGF-23が健常時においてもリンや1,25Dの代謝バランスを維持する上で重要な役割を有することを明らかにした。従って、FGF-23は、リン代謝お



よびリン代謝が深く関わる腎臓疾患、腸管疾患、ミネラル代謝性疾患、ビタミンD代謝異常疾患の病態に関与していることが考えられる。さらに、1,25D又はその誘導体の投与を受けている患者においてもFGF-23が変動することにより病態や治療効果に影響を与えていることが考えられる。本発明の測定系はこれらの病態の理解を深め、よりの確な医療行為を可能にするものであると考えられる。

#### 【0042】

#### 4. FGF-23活性を抑制することを特徴とする疾患治療方法

FGF-23の過剰作用が疾患を惹起することが、腫瘍性骨軟化症、ADHRで知られている。また、本発明の中でXLHにおいてもFGF-23が血中高値を呈することを我々は明らかにした。FGF-23を抑制することは、低リン血症やクル病、骨軟化症の改善につながると考えられる。FGF-23が腎臓の近位尿細管上皮細胞に作用することを考えると、尿細管の機能障害の治療に有用である可能性が考えられる。また、FGF-23のリン代謝調節やビタミンD代謝調節における役割を考えると、リン代謝異常疾患やCa代謝異常疾患、骨代謝異常疾患、腎機能低下に伴う代謝異常疾患、腎不全血液透析に伴う代謝異常、腎移植に伴う疾患においてFGF-23が好ましくない作用として働いている可能性が考えられる。同様に腎移植後に高頻度で低リン血症が認められ、骨減少症を伴うことが報告されており、このような症例においてもFGF-23の関与が示唆されている。このような場合においては、異常に上昇したFGF-23を正常レベルに戻すだけでなく、薬理的処置として正常値を示すFGF-23をさらに低下させる必要がある場合も考えられる。実施例27、実施例28に示すようなFGF-23の活性を中和あるいは修飾しうる抗体は種々の疾患の治療に有用であると考えられる。実施例25に示すように腎機能低下による高リン血症を呈する動物において、FGF-23が著しく高値を示すことが見出された。腎機能低下に伴うビタミンD代謝異常の少なくとも一部はこのFGF-23の上昇による作用であることが考えられる。本発明の抗体を用いてFGF-23の活性を中和あるいは除去することで、このFGF-23の異常高値に伴う疾患を治療できることが考えられる。とくにリン代謝、カルシウム代謝、ビタミンD代謝の是正により、低カルシウム血症、副甲状腺機能亢進症、異所性石灰化、掻痒などのミネラル代謝異常に伴う疾患や腎性骨異栄養症、透析骨症といった腎機能低下に伴う骨代謝異常疾患に有用であると

考えられる。さらには血液透析患者で問題となっている石灰化を伴う心血管機能低下症にも有用であると考えられる。また、実施例27に示すように、正常な代謝状況においてもFGF-23がミネラル代謝やビタミンD代謝に重要な役割を有していることが明らかとなった。上述の高リン血症でFGF-23が誘導されるだけでなく、FGF-23が速やかに1,25Dを低下させることと1,25DによりFGF-23が速やかに誘導されることを考えると、本発明のFGF-23の活性を中和あるいは修飾する抗体は、FGF-23の作用を抑制してリン代謝やビタミンD代謝、カルシウム代謝を調節するだけでなく、間接的に副甲状腺ホルモンやカルシトニンといったカルシウム代謝ホルモンを調節し、ミネラル代謝異常疾患において広範な有用性があると考えられる。特に、ミネラル代謝のバランスと代謝回転が関連して様々な病態を示す骨粗鬆症や骨減少症、骨硬化症、パジェット病あるいは、高カルシウム血症や副甲状腺機能低下症の治療に有効であることが期待される。以上のように本発明の抗体が上述した疾患の一つ以上の疾患に有用であることが考えられる。

#### 【0043】

##### 5. FGF-23の生物活性に対する中和抗体

FGF-23は上述のように生体の代謝調節において重要な役割を有していると考えられる。このような因子の生物活性を調節する方法は、種々の疾患の治療や予防に役立つと考えられる。抗体は抗原分子との特異的結合を特徴とするが、その認識部位により抗原分子の構造や機能に影響を与えることが知られている。そこで我々は、FGF-23の機能調節とくに生物活性を抑制することができる抗体を単離同定することを目指した。実施例27、28に示すように、FGF-23を認識する抗体を投与することによって血清リンの上昇と血清1,25D濃度が上昇することを見出した。特に、用いた発明の抗体は実験的にマウスの体内で生産させたヒトFGF-23の血清リンおよび1,25Dを低下させる活性を完全に消失させた。さらに、ヒトFGF-23を産生させていない対照マウスにおいても、血清リンの上昇とビタミンDの上昇が確認された。この減少はFGF-23を投与した場合に見られる変化と全く逆のものであり、発明の抗体はマウスの内因性FGF-23をも抑制したと考えられる。一方でこの現象は、FGF-23は病態時だけでなく正常時においてもリンやビタミンD代謝を制御する因子として働いていることを示すものである。発明のFGF-23の生物活

性を消失あるいは減弱させることができる抗体は、FGF-23の生物活性が反映する生理的および病理的状況を調節しうるものである。この発明の抗体が制御しうるFGF-23の生物活性の範囲はリン代謝やビタミンD代謝だけに規定されるものではなく、FGF-23が有するあらゆる生物活性、生理活性を制御しうるものである。

【0044】

#### 6. 抗FGF-23抗体を含む医薬組成物

本発明の抗体または医薬組成物は、体内で生産されたFGF-23やFGF-23を発現する細胞に関連する種々の疾患または症状の治療または予防への適用が可能である。本発明の抗体は、腫瘍性骨軟化症、ADHR、XLHに対して医薬組成物として用いることができ、これらの疾患に共通して認められる低リン血症、骨石灰化不全、骨痛、筋力低下、骨格の変形、成長障害について改善効果が期待できる。また上述のようにFGF-23が生理的条件下で重要な役割を果たしており、FGF-23のリン代謝調節作用やFGF-23が調節するビタミンD代謝を介したカルシウム代謝調節作用を本発明の抗体が制御することによって、骨粗鬆症に代表されるミネラル代謝やビタミンD代謝の異常に起因する疾患に対して治療的および予防的に医薬組成物として用いることができる。さらに腎不全において血中のFGF-23濃度の上昇が明らかであることから、腎性骨異栄養症や透析骨症に代表される腎不全や血液透析に合併する疾患に対しても治療的および予防的に医薬組成物として用いることができる。

【0045】

また、本発明の抗体に治療試薬を結合させたものを医薬組成物として用いることができる。腫瘍性骨軟化症においては、腫瘍がFGF-23を過剰産生して病態を惹起することが知られおり、現在で唯一の治療法はその原因腫瘍を除去することである。しかしながら、原因腫瘍は小さい事が多く、MRIでの精力的な検索でようやく発見できるという例も複数報告されている。また、腫瘍が発見できないことから原因不明の低リン血症や骨軟化症と診断されている例も多いと考えられている。このような疾患に対して本発明の抗体は、FGF-23との親和性により、FGF-23産生腫瘍に集積することが考えられる。この性質を利用して腫瘍を退縮させる方法として治療試薬を本発明の抗体に結合させて用いることが有効である。抗体へ

結合させる治療用試薬としては、①ヨード( $^{131}\text{Iodine:}^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{Iodine }^{125}\text{I}$ )、イットリウム( $^{90}\text{Yttrium:}^{90}\text{Y}$ )、インジウム( $^{111}\text{Indium:}^{111}\text{In}$ )、テクネチウム( $^{99\text{m}}\text{Technetium:}^{99\text{m}}\text{Tc}$ )等の放射核種 (J.W.Goding., *Monoclonal Antibodies: principles and practice.*, 1993 ACADEMIC PRESS)、②緑膿菌毒素 (*Pseudomonas exotoxin*)、ジフテリアトキシン (*diphtheria toxin*)、リシン (*Ricin*) のような細菌毒素、および③メトトレキサート (*Methotrexate*)、マイトマイシン (*mitomycin*)、カリキアマイシン (*Calicheamicin*) などの化学療法剤 (D.J.King., *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies.*, 1998 T.J. International Ltd, M.L.Grossbard., *Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer*., 1998 Marcel Dekker Inc) 等が挙げられ、より好ましくは、Maytansinoid等のプロドラッグが良い (Chari et al., *Cancer Res.*, 1992 Vol52:127, Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996 Vol93:8681)。

## 【0046】

また、抗ヒトFGF-23抗体の精製品を含有する製剤もまた本発明の範囲内に含まれる。このような製剤は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、他の抗体または抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用してもよい。投与経路は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の注射または配薬を含む非経腸的ルートである。

## 【0047】

本発明の医薬組成物を患者に投与する場合は、有効投与量は、一回につき体重1kgあたり 20 ng から200 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.001 ~ 10000 mg/body、好ましくは0.005~2000 mg/body、さらに好ましくは0.01 ~ 1000 mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

## 【0048】

## 7. 抗FGF-23抗体を含む医療器具

血液透析、血漿交換、細胞採取を目的とする治療技術において、採取した体液の一部や体外循環させた体液から生体内の物質の除去、交換、採取が行われている。このような治療技術において、本発明の抗体はFGF-23分子と特異的に結合する性質を利用して、生体内のFGF-23分子の選択的除去やFGF-23発現細胞の選択的回収に有用である。血液透析や血漿交換においては、体液が接する素材の一部に本発明の抗体を固定化する方法などが考えられる。透析膜の材質としては、セルロース膜などのほか、合成高分子膜であるポリアクリロニトリル膜、ポリメチルメタクリレート膜、エチレンビニルアルコール膜、ポリスルホン膜、ポリアミド膜、ポリエーテルスルホン／ポリアリレート膜などが用いられているが、このような膜に抗体を共有結合にて固定し、血液透析に用いることが考えられる。また、セファロースなどのビーズに抗体を結合させたものを充填したカラムとして体液の分離を行う方法も考えられる。また、磁気ビーズ上に抗体を固定化し、抗体結合分子と混和して結合を促したのちに、磁石を用いて抗体と対象物質の複合体を回収する方法なども可能であり、このような方法で細胞を回収して治療に用いることも行われている。このように、医療用具として適切な基材に本発明の抗体を結合させて医療器具として用いることができる。

【0049】

## 8. FGF-23の分子構造や生物活性を制御する方法

蛋白質がもつ生物活性を生体内で維持する上で重要な点は、蛋白質の3次構造を生体内で維持したまま存在させることである。生体因子のなかでも、インスリン様成長因子（IGF：Insulin-like growth factor）や腫瘍増殖因子ベータ（TGF- $\beta$ ：Transforming growth factor- $\beta$ ）に見られるように生体で別の蛋白質と結合して、その生物活性を制御している例が多く認められる。FGF-23においては、これまでのところ結合蛋白というものは知られていない。本発明の抗体の中には、実施例9に示すように部分ペプチドとは結合せずにFGF-23の構造を強く認識していると考えられる2C3B抗体が含まれている。これらの抗体あるいは抗体の一部を用いてFGF-23に結合させた状態を作り出すことによりFGF-23の生体内での生物活性を調節できることが考えられる。

## 【0050】

## 9. FGF-23を効率良く除去する方法

腎機能の著しい低下を来すと、尿毒症物質の体内からの除去が必要となる。低分子量の尿毒症物質の除去については、透析膜を利用した血液透析が実用化されている。しかしながら、高分子量の蛋白質の除去については依然として課題となっている。本発明の抗体は、FGF-23の特異的除去としても利用可能である。血液透析において行われているように、血液を体外循環させる血液を本発明の抗体を固相化した器材に接触させることでFGF-23を選択的に除去することができる。FGF-23が過剰に存在するような疾患の治療用具としての応用が考えられる。実施例25に示すように腎機能不全時においてFGF-23が高値を示すことからFGF-23が透析合併症の惹起因子である可能性が考えられる。特にFGF-23が1,25Dを低下させる作用があることから、腎機能低下に伴う1,25Dの低下の惹起因子としてFGF-23が働いている可能性が高く、透析患者において本発明の抗体を用いてFGF-23を除去する方法は透析合併症の治療に有用であることが考えられる。

## 【0051】

以上のように、本発明はFGF-23を認識するだけでなく、FGF-23が関係する生理的、薬理的、病理的作用を調節することができ、疾患の治療、予防、診断に応用することができる抗体を取得することにより本発明を完成した。

## 【0052】

## 10. 競合抗体の特定

FGF-23との結合において本発明の抗体と同じ部位あるいは極めて近傍部位を認識する抗体は、ここで示した特性と同等の性質を示すものと考えられる。このような事実上同等な抗体は、競合実験を行うことで見分けることができる。二種以上の抗体間を共存させた場合、抗原結合において互いに排他的な結合特性を示すものが競合する抗体と定義される。発明の競合抗体を特定するには、標識した発明抗体とFGF-23蛋白質が結合する条件において標識していない抗体を過剰量存在させることで判定できる。添加した抗体が発明抗体とFGF-23蛋白質の結合を著しく低下させる場合は競合すると判断できる。

## 【0053】

## 【実施例】

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される様態や技術的範囲のみに限定されるものではない。

## (実施例 1) 組換え体 FGF-23 発現ベクターの作製

## (1) FGF-23H 蛋白質発現ベクターの構築

FGF-23 をコードする cDNA は、腫瘍性骨軟化症の責任腫瘍の cDNA ライブラリーを鋳型とし、F1EcoRI プライマー（配列番号 2）と LHisNot プライマー（配列番号 3）と LA-Taq DNA polymerase を用いて 96℃ で 1 分間保温した後、96℃ で 30 秒、55℃ で 30 秒、72℃ で 30 秒からなる工程を 1 サイクルとした 35 サイクルの PCR を実施することにより増幅した。F1EcoRI プライマーは FGF-23 をコードする塩基配列のさらに 5' 側上流に存在する配列にアニールし、その増幅断片の FGF-23 をコードする領域の 5' 側に EcoRI 制限酵素部位を付加する。LHisNot プライマーは FGF-23 をコードする配列の終始コドンの 5' 側の配列とアニールする配列と His6-tag 配列（His-His-His-His-His-His）をコードする配列に続く終始コドンと NotI 制限酵素配列を含む。その結果、増幅断片は FGF-23 蛋白質の C 末端に His6-tag 配列を付加したものをコードすることになり、その下流に NotI 制限酵素部位を有する。この増幅断片を EcoRI と NotI で消化し、同様に EcoRI と NotI で消化した動物細胞発現ベクターである pcDNA3.1Zeo（米国 Invitrogen 社）と連結した。このように作製した発現ベクターをクローニングし、塩基配列を決定して目的の His6-tag 配列が付加された FGF-23 蛋白質をコードしていることを確認した。このベクターを pcDNAFGF-23H と称す。

F1EcoRI : CCGGAATTCAGCCACTCAGAGCAGGGCACG（配列番号 2）

LHisNot :

ATAAGAATGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGATGAACTTGGCGAA（配列番号 3）

【 0 0 5 4 】

## (2) FGF-23 蛋白質発現ベクターの構築

pcDNA/FGF-23H を鋳型として F1EcoRI プライマーと LNot プライマー（配列番号 4）と LA-Taq DNA polymerase を用いて 94℃ で 1 分間保温した後、94℃ で 30 秒、55℃ で 30 秒、72℃ で 1 分からなる工程を 1 サイクルとした 25 サイクルの PCR を実施する

ことにより増幅した。反応終了後、PCR産物の末端をT4 DNA polymerase (スイス、Roche社) により平滑化したのち、Polynucleotide kinase (スイス、Roche社) を用いてDNA末端のリン酸化を行うことでFGF-23蛋白質をコードするcDNA断片を調製した。発現ベクターpCAGGS (Niwa H, et al., Gene. 1991, 108:193-199) をEcoRIで消化しKlenow断片 (スイス、Roche社) を用いて末端を平滑化し、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ (日本、宝酒造社) を用いて脱リン酸化を行った。このように調製したFGF-23をコードするcDNA断片とpGAGGSベクターを連結した。このように作製した発現ベクターをクローニングし、塩基配列を決定して目的のFGF-23蛋白質をコードする配列が的確に挿入されていることを確認した。このベクターをpGAGGS/FGF-23と称す。

## 【0055】

また上述のF1EcoRIプライマーとLNotプライマーで増幅したFGF-23をコードする断片をEcoRIとNotIで消化したのち精製した。これを、発現ベクターであるpEAK8 (米国、Edge Biosystem社) に分子内リボゾームエントリー配列 (IRES) と増強型緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を連結したpEAK8/IRES/EGFPベクターのEcoRIとNotI制限酵素部位に挿入してクローニングした。取得したプラスミドの塩基配列を決定し、FGF-23蛋白質をコードしていることを確認した。このベクターをpEAK8/IRES/EGFP/FGF-23と称す。

LNot: ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATGAACTTGCGGAA (配列番号4)

## 【0056】

pGAGGS/FGF-23をEcoRIで消化して直鎖化したのち、Klenow断片 (スイス、Roche社) を用いて末端を平滑化した。これをさらにBamHIで消化してFGF-23のcDNAを含むDNA断片をアガロース電気泳動で分離精製した。また、発現ベクターINPEP4をBglIIIで消化した後、Klenow断片 (スイス、Roche社) を用いて末端を平滑化した。さらにBamHIで消化したのちアガロース電気泳動でベクターを精製した。これらのFGF-23 cDNAを含む断片とベクターを連結した。このように作製した発現ベクターをクローニングし、塩基配列を決定して目的のFGF-23蛋白質をコードする配列が的確に挿入されていることを確認した。このベクターをINPEP4/FGF-23と称す。



【0057】

## (3) FGF-23RQHの発現ベクターの構築

FGF-23蛋白質は、179番目のArg残基と180番目のSer残基の間で蛋白切断を受けやすいことが見出された。この切断部位のN末側アミノ酸配列は蛋白変換酵素の認識配列であるArg-X-X-Arg配列に一致するArg<sup>176</sup>-His<sup>177</sup>-Thr<sup>178</sup>-Arg<sup>179</sup>（配列番号31）であり、またADHRでのミスセンス変異がこの176番目又は178番目のArg残基の置換変異であることが知られている。そこで我々は、蛋白変換酵素による切断に耐性を示し、尚かつADHRに見られる変異FGF-23のモデルとしてC末端にHis6-tagを有し、176番目と179番目のArg残基をGln残基に置換した変異FGF-23蛋白質（以下FGF-23RQHという）を実験的に作製するためのベクター構築を行った。作製方法は、ArgをGlnに置換するための塩基置換配列を含む順方向プライマーであるRQF（配列番号5）と逆方向プライマーであるRQR（配列番号6）を合成した。さらに、この塩基置換プライマーと組み合わせて変異導入部位の5'側と3'側のFGF-23配列を増幅するためのプライマーであるME1（配列番号7）とHnt（配列番号8）を作製した。ME1はFGF-23 cDNAがコードする開始コドンを含む部分の順方向のプライマーでありEcoRI制限酵素配列を有する、HntはFGF-23 cDNAがコードする終始コドンの前にHis6-tag配列をコードするコドン配列を挿入でき、NotI制限酵素配列を付加することができる逆方向プライマーである。

RQF: ATACCACGGCAGCACACCCAGAGCGCCGAG（配列番号5）

RQR: CTCGGCGCTCTGGGTGTGCTGCCGTGGTAT（配列番号6）

ME1: ATGAATTCCACCATGTTGGGGGCGCCCTCAGG（配列番号7）

Hnt:

ATGCGGCCGCTAATGATGATGATGATGATGGATGAACTTGCGGAAGGG（配列番号8）

【0058】

10 ngのpGAGGS/FGF-23を鋳型としてRQFとHntの組み合わせとME1とRQRの組み合わせのプライマー（各200 nM）でPCR反応を実施した。反応はpfu DNA polymerase（米国、Promega社）を用い、94℃で1分間保温した後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分からなる工程を1サイクルとした25サイクル実施した。この様にして得た2種類の反応液を10倍に希釈し、そのうちの1 μlずつを混和して鋳型

とし、これにMEIとHntが終濃度200 nMとなるように添加した50  $\mu$ lのPCR反応液を調製し、94℃で1分間保温した後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分からなる工程を1サイクルとした25サイクルのPCR反応を実施した。ここではLA Taq DNA polymerase（日本、宝酒造社）を使用した。得られた約800bpの増幅産物を、EcoRIとNotIで消化したのちに精製してインサートDNAを取得した。これを、発現ベクターであるpEAK8（米国、Edge Biosystem社）に分子内リボゾームエンター配列（IRES）と増強型緑色蛍光蛋白質（EGFP）を連結したpEAK8/IRES/EGFPベクターのEcoRIとNotI制限酵素部位に挿入してクローニングした。取得したプラスミドの塩基配列を決定し、目的の176番目と179番目のArgがGlnに変換され、C末端にHis6-tag配列が付加された変異FGF-23蛋白質をコードしていることを確認した。このベクターをpEAK8/IRES/EGFP/FGF-23RQHと称す。

【 0 0 5 9 】

（実施例 2）組換え体FGF-23蛋白質および組換え体変異FGF-23蛋白質の発現

（1） FGF-23H発現細胞の取得

約20  $\mu$ gのpcDNAFGF-23Hをベクター中のアンピシリン耐性遺伝子内にあるFspI制限酵素部位で切断して直鎖化し、精製した。これを 10  $\mu$ lの純水に溶解し、 $1 \times 10^7$ 個のCHO Ras clone-1細胞（Shirahata, S., et al. Biosci Biotech Biochem, 59: 345-347, 1995）と混和してGene Pulser II（米国、Bio Rad社）を用いて電気穿孔法にて細胞への遺伝子導入を行った。この細胞10% FCS を含むMEM  $\alpha$  培養液（米国、Gibco BRL社）で24時間培養したのち、終濃度 0.5 mg/mlとなるようにZeocin（米国、Invitrogen社）を添加して1週間培養した。接着し増殖した細胞をトリプシンで遊離して、終濃度 0.3 mg/mlのZeocin存在下で限界希釈法によるクローニングを行い、35種のクローン化細胞を得た。これらの細胞の中でFGF-23H蛋白質を最もよく発現する細胞を以下に示すウェスタンブロッティングにて同定した。各クローン化細胞の培養上清を採取して、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行ったのち、PVDF膜（米国、Millipore社）に蛋白質を転写し、抗His-tag（C末）抗体（米国、Invitrogen社）とECL発光システム（米国、Amersham Pharmacia Biotech社）を用いて約32kDa付近のFGF-23H蛋白質に由来するシグナルを検出した。その結果、#20と称すクローンにおいて最も高い発現が認め

られ、これをCHO-OST311と命名して独立行政法人産業技術総合研究所、特許微生物寄託センター（日本、茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に寄託した（受託番号：FERM BP-7273）。本明細書では、CHO-OST311をCHO-FGF23Hと称する。

#### 【 0 0 6 0 】

##### (2) FGF-23およびFGF-23RQH発現細胞の取得

pEAK8/IRES/EGFP/FGF-23と pEAK8/IRES/EGFP/FGF-23RQHベクターのCHO Ras clone-1細胞への導入は膜融合脂質を用いた遺伝子導入法により行った。CHO Ras clone-1細胞を6-well plateに底面の約60%を細胞が覆う程度に培養する。そして培養液を除去し、血清を含まないMEM $\alpha$ 培養液を1 ml添加する。導入するベクター2.5  $\mu$ gと10  $\mu$ lのTransfectam（登録商標）（米国、Promega社）をそれぞれ50  $\mu$ lの血清を含まないMEM $\alpha$ 培養液と混和して、両者を混合して10分間静置したのち、両者を混合して予め準備しておいた6-well plateに添加した。2時間培養した後、このDNAを含む培養液を除去して10%のFCSを含む培養液に置換して終夜培養した。翌日、終濃度が5  $\mu$ g/mlとなるようにPuromycin（米国、Sigma社）を添加して、薬剤耐性細胞を選択した。この様にして得られた薬剤耐性細胞は前述のFGF-23H発現細胞の取得と同様に限界希釈法にてクローン化を行った。さらにウェスタンブロッティングにより目的の蛋白質を最もよく発現する細胞株を取得した。これらの細胞をそれぞれ、CHO-FGF23、CHO-FGF23RQと称す。

#### 【 0 0 6 1 】

##### (3) 組換え体蛋白質の精製

CHO-FGF23Hの培養上清中の組換え体をC末端のHis6-tag配列に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングにて検出すると、図1Aに示すように32 kDa付近のバンドと10 kDa付近のバンドが認められた。この二つのバンドをゲルから切り出しN末端側のアミノ酸配列を決定したところ、分子量の大きい方のバンドは配列番号1の25番目からのアミノ酸配列が検出され、FGF-23蛋白質から分泌過程でシグナル配列が除去されたものと考えられた。一方、分子量の小さいバンドからは配列番号1の180番目からのアミノ酸配列が確認され、179番目と180番目の間での切断により生じた断片であることが判明した。また、FGF-23のN末側を認識す

るポリクローナル抗体を用いて検出することで、179番目までの配列を持つと考えられるペプチドの存在も認められた。

#### 【 0 0 6 2 】

CHO-FGF23H細胞の培養上清1000 mlを16,200 gで15分間、4℃で遠心分離し、浮遊細胞を除去した後、上清を内径30 mm X長さ200 mmのカラムに充填したSP-sepharose FF(登録商標)(米国、Amersham Pharmacia Biotech社)に通すことで、配列番号1の180から251番目に相当するペプチドにHis6-tagが付加したペプチドが素通りし、25～251番目のペプチド(以下、全長FGF-23蛋白質ということがある)にHis6-tag配列を付加したものはカラムに吸着した。このカラムに50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.7)中で0から0.7 MまでのNaCl濃度勾配で吸着物質を溶出させたところ、約0.3MのNaClで溶出される画分にHis6-tagが付加した全長FGF-23蛋白質が認められ、約0.4Mで溶出される画分に配列番号1の179番目よりN末側の配列を持つと考えられるペプチドが確認された。このようにSP-Sepharoseカラムで分離された画分は次に、金属アフィニティカラム、Talon Superflow(登録商標)(米国、Clontech社)にかけることでさらに分離する事が出来た。179番目よりN末側の配列についても金属カラムとの親和性を有しており、精製に有効であった。さらにSP-Sepharoseカラムにて精製を行い、CBB染色で単一のバンドとして全長のFGF-23Hを取得することができた。この結果を図1Bに示す。

#### 【 0 0 6 3 】

FGF-23蛋白質も同様の方法で精製することができる。CHO-FGF23の培養上清をポアサイズが0.2  $\mu$ mのメンブレンであるSuperCap(登録商標)(米国、Pall Gelman Laboratory社)でろ過し、ろ過された溶液をSP-Sepharose FF(米国、Amersham Pharmacia Biotech社)に通した。カラムとの親和性が弱い物質を50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.7で洗浄、溶出させた。カラム保持された蛋白を0から0.7 MまでのNaCl濃度勾配で溶出させたところ、約0.3MのNaClで溶出される画分に全長FGF-23蛋白質が認められた。これを金属アフィニティカラムであるTalon Superflow(登録商標)(米国、Clontech社)に吸着させたのち、50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.7で洗浄したのち、Imidazoleの濃度を変化させて添加し蛋白を溶出精製した。さらに、目的の蛋白質を含む画分をSP Sepharose FF

カラムに吸着、溶出させて精製した。同様な方法でCHO-FGF23RQ上清より全長FGF-23RQ蛋白質を精製した。

## 【 0 0 6 4 】

(実施例3) ヒトFGF-23に対するヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門(安東民衛ら著作、講談社発行 1991)等に記載されるような一般的方法に従って調製した。被免疫動物は、Balb/cマウスを用い、ヒトFGF-23の免疫は免疫源の違いにより以下の2種類の方法で行なった。

## 【 0 0 6 5 】

## (1) ベクター投与と組換え体蛋白質投与の組み合わせによる免疫

Balb/cマウスに、実施例1で作製したINPEP4/FGF-23ベクター(10または50  $\mu$ g/匹)をTrans IT(登録商標) In Vivo Gene Delivery System試薬(日本、宝酒造社)を静脈より導入して初回免疫を実施した。初回免疫から同ベクターを1週間後に1回導入し追加免疫した。さらに、実施例2で作製したFGF-23RQH蛋白質(20-30  $\mu$ g/匹)をスクアレン、Tween80、Monophosphoryl lipid AおよびTrehalose dimycolateを含むRIBIアジュバント(米国、Corixa社)に懸濁しエマルジョンを調製した後、腹腔内注射により4回または5回追加免疫し、さらに以下に述べる脾臓細胞の取得4日前に実施例2で作製したFGF-23H蛋白質(18  $\mu$ g/匹)を尾静脈内注射により免疫した。

## 【 0 0 6 6 】

## (2) ヒトFGF-23を用いた免疫

Balb/cマウスに、実施例2で作製したFGF-23(22  $\mu$ g/匹)を上述のRIBIアジュバントに懸濁して腹腔内注射により初回免疫した。さらに、同蛋白質を腹腔内注射により1週間毎に1回、4週間にわたり追加免疫し、以下に述べる脾臓細胞の取得3日前にFGF-23(10  $\mu$ g/匹)を尾静脈内注射により免疫した。

## 【 0 0 6 7 】

## (3) ハイブリドーマの作製と選別

上述のように免疫したマウスから脾臓を摘出し、それより回収した脾臓細胞を

マウスミエローマSP2/0 (ATCC: CRL1581) と 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール1500 (日本、ロッシュダイアグノスティクス社) を用いて細胞融合させ、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum、FCS) とヒポキサンチン(H)、アミノプテリン(A)、チミジン(T)を含有するHAT含有DMEM培地 (米国、Gibco BRL社) 中で培養することにより行った。さらに、HT含有DMEM培地を用いて限界希釈法によりクローニングを実施した。単一細胞に由来するクローン化ハイブリドーマを取得した。

【0068】

(4) 抗FGF-23抗体を産生するクローン化したハイブリドーマの選別

ハイブリドーマが産生する抗体とFGF-23蛋白質との結合性を調べることで、FGF-23蛋白質を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別した。上述の第一の方法で免疫して得たハイブリドーマの選別は以下のように実施した。50 mM  $\text{NaHCO}_3$  の溶液に1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度に希釈したFGF-23H蛋白質溶液を、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp (登録商標)、米国、Nunc社) の各ウェルに50  $\mu\text{l}$  ずつ加え、37°Cで30分または4°Cで12時間インキュベートし、FGF-23H蛋白質をマイクロプレートに吸着させた。次にこの溶液を除去し、各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlock (登録商標) Blocking Buffer, 米国、PIERCE社) を加え室温で30分間インキュベートしたのち、各ウェルを0.1%のTween20を含有するTris-buffered saline (500 mM NaCl 含有TRIZMA pre-set crystals (登録商標) 米国、Sigma社) (T-TBS) で2回洗浄した。このようにFGF-23H蛋白質をコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清を50  $\mu\text{l}$  加え、30分間反応させた後、各ウェルを、T-TBSで2回洗浄した。次いで、各ウェルに50  $\mu\text{l}$  ずつ3000倍希釈した過酸化酵素標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (米国、Zymed laboratories社) を加え、室温下で30分間インキュベートした。これをT-TBSで3回洗浄後、テトラメチルベンジジン (デンマーク、DAKO社) を含む基質緩衝液を各ウェルに50  $\mu\text{l}$  ずつ加え、室温下で15分間インキュベートした。次いで、0.5 M硫酸を各ウェルに50  $\mu\text{l}$  ずつ加え、反応を止めた。参照波長を570 nmとして波長450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-300、日本、コ

ロナ電気社)で測定した。ここで、明確な吸光度の上昇を示したハイブリドーマを選別し、さらに、FGF-23蛋白質を用いて同様の実験を実施してFGF-23との結合が再確認されたクローンを選別した。これより、FGF-23蛋白質を認識する抗体を産生するハイブリドーマとして9種のクローンを得た。

この中には後に示す1C3H、1D6A、2A2B、2C3Bが含まれていた。

#### 【0069】

上述の第二の方法で免疫して得たハイブリドーマの選別は、以下のように実施した。50 mM NaHCO<sub>3</sub>の溶液に1  $\mu$ g/mlの濃度に希釈したFGF-23蛋白質溶液を、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp (登録商標)、米国、Nunc社)の各ウェルに50  $\mu$ lずつ加え、4℃で10時間インキュベートしてFGF-23蛋白質をマイクロプレートに吸着させた。次にこの溶液を除去し、各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlock (登録商標) Blocking Buffer, 米国、PIERCE社)を加え室温で30分間インキュベートしたのち、各ウェルを0.1%のTween20を含有するTris-buffered saline (T-TBS)で2回洗浄した。このようにFGF-23H蛋白質をコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清を50  $\mu$ l加え、30分間反応させた後、各ウェルを、0.1%のTween20を含有するTris-buffered saline (T-TBS)で2回洗浄した。次いで、各ウェルに50  $\mu$ lずつ3000倍希釈した過酸化酵素標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (米国、Zymed laboratories社)を加え、室温下で30分間インキュベートした。これをT-TBSで3回洗浄後、テトラメチルベンジジン (デンマーク、DAKO社)を含む基質緩衝液を各ウェルに50  $\mu$ lずつ加え、室温下で15分間インキュベートした。次いで、0.5 M硫酸を各ウェルに50  $\mu$ lずつ加え、反応を止めた。参照波長を570 nmとして波長450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-300、日本、コロナ電気社)で測定した。ここで、明確な吸光度の上昇を示したハイブリドーマを選別した。これより、FGF-23蛋白質を認識する抗体を産生するハイブリドーマとして新たに4種のクローンを得た。この中に3C1Eが含まれていた。

#### 【0070】

このように取得したFGF-23蛋白質を特異的に認識する抗体のサブクラスをIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (米国、Roche社)を用

いて同定した。結果は表1に示した。

【0071】

【表1】

抗ヒト FGF-23 抗体

ハイブリドーマクローン	サブクラス	ELISA 450 nm-570 nm
1C3H	IgG1 (k)	3.39
1D6A	IgG1 (k)	3.21
2A2B	IgG1 (k)	2.67
2C3B	IgG1 (k)	1.21
3C1E	IgG1 (k)	3.5 以上

【0072】

上記ハイブリドーマクローンのうち、3つのハイブリドーマクローン2C3B、3C1E、1D6Aを、平成13年12月26日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1）にブダペスト条約に基づき国際寄託した。受託番号は以下の通りである。

2C3B : FERM BP-7838

3C1E : FERM BP-7839

1D6A : FERM BP-7840

【0073】

（実施例4）モノクローナル抗体の調製

(1) 抗FGF-23抗体を含む培養上清の調製

抗FGF-23抗体産生ハイブリドーマを10  $\mu$ g/mlのウシインシュリン（米国、Sigma社）、5.5  $\mu$ g/mlのヒトトランスフェリン（米国、Sigma社）、0.01mMのエタノールアミン（米国、Sigma社）、5 ng/mlの亜セレン酸ナトリウム（米国、Sigma社）を含有するeRDF培地（日本、極東製薬社）に馴化した。抗体を調製するためのハイブリドーマの培養はスピナーフラスコで実施した。培養液を孔径が0.2  $\mu$ mのフィルター（米国、Pall Gelman Laboratory社）を通すことでハイブリドーマ等の雑排物を除去し、抗体を含む培養上清を回収した。

【0074】



## (2) プロテインGを用いたモノクローナル抗体の精製

抗FGF-23抗体を含む培養上清をプロテインG Sepharose 4 FFカラム（米国、Amersham Pharmacia Biotech社）に通して抗体をカラムに吸着させ、0.1 M グリシン緩衝液（pH2.8）を用いて溶出させた。溶出画分は1 M Tris-HCl を添加してpH 7.2に調整した。このように調製した抗体溶液を分画分子量10000カットの透析膜（米国、Spectrum Laboratories社）を用いてPBS(-)で透析置換し、孔径0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターMILLEX-GV（米国、Millipore社）でろ過滅菌し、精製抗FGF-23抗体を得た。精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 ODとして算出した。

【0075】

## (3) プロテインAを用いたモノクローナル抗体の精製

プロテイン A 担体カラム（日本、免疫生物研究所社）を用い、吸着緩衝液としてグリシン緩衝液（pH8.9）、溶出緩衝液としてクエン酸緩衝液（pH 4.0）を用いて抗FGF-23抗体を含む培養上清から抗体をアフィニティー精製した。この抗体を含む溶出画分に1 M Tris-HCl を添加してpH7.2 付近に調整した。次に透析膜を用いてこの抗体を含む溶液をPBS(-)に置換し、さらに孔径0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過滅菌し、精製抗FGF-23抗体を得た。精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出した。

このようにして得られた各精製モノクローナル抗体を、産生するハイブリドーマの名前を用いて示すことにする。例えばハイブリドーマ1D6Aが産生する抗体に関しては1D6A抗体と記載することにする。

【0076】

## (実施例5) 抗FGF-23部分ペプチドポリクローナル抗体の作製

## (1) FGF-23部分配列に相当するペプチドの合成

配列番号1のポリペプチドをMacVector version 6.5.1の計算機能を用いて、疎水性度を予測し、ペプチド抗体作製に適した部位を予測した。親水性の程度が高く、かつ糖鎖修飾やリン酸化部位となりうる部位を除外するという条件で抗体作製に適切と考えられる部分配列を抽出した。その結果、配列番号1の残基番号25番目チロシンから始まる15残基のアミノ酸からなるペプチドのC末端にシステイン

残基を付加したペプチドhFGF23-25(配列番号9)、48番目アルギニンから始まる20アミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したペプチドhFGF23-48(配列番号10)、114番目アルギニンから始まる15アミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したhFGF23-114(配列番号11)、148番目グリシンから始まる16アミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したペプチドhFGF23-148(配列番号12)、170番目アスパラギンから始まる10アミノ酸残基からなるペプチドのN末端にシステイン残基を付加したペプチドhFGF23-170(配列番号13)、174番目プロリンから始まる14アミノ酸残基からなるペプチドにC末端にシステイン残基を付加したhFGF23-174(配列番号14)、180番目セリンから始まる15アミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したペプチドhFGF23-180(配列番号15)、210番目Leuから始まる13アミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したペプチドhFGF23-210(配列番号16)および237番目グリシンから始まる15アミノ酸残基からなるペプチドhFGF23-237(配列番号17)を抗原として選択し化学合成した。

hFGF23-25: YPNASPLLGSWSGGLC (配列番号9)

hFGF23-48: RNSYHLQIHKNHVDGAPHQC (配列番号10)

hFGF23-114: RFQHQTLNGYDVYHSPQYHC (配列番号11)

hFGF23-148: GMNPPPYSQLSRNEC (配列番号12)

hFGF23-170: CNTPIPRRHTR (配列番号13)

hFGF23-174: PRRHTRSAEDDSERC (配列番号14)

hFGF23-180: SAEDDSERDPLNVLC (配列番号15)

hFGF23-210: LPSAEDNSPMASDC (配列番号16)

hFGF23-237: GGTGPEGCRPFAKFI (配列番号17)

# 【 0 0 7 7 】

## (2) 抗FGF-23部分ペプチドに対するポリクローナル抗体の調製

上述の全てのペプチドはそれぞれの持つシステイン残基を介してキャリア蛋白質であるウシサイログロブリンと結合させ、免疫に供した。免疫は一つの抗原ペプチドに対して3羽のウサギを用いた。初回免疫は、1羽あたり100 $\mu$ gのキャリア蛋白質に結合したペプチドをフロイト完全アジュバントでエマルジョンとしたもの

をウサギの皮内または皮下に投与した。初回免疫の1週間後に100  $\mu$ gのキャリア蛋白に結合したペプチドをフロイト不完全アジュバントでエマルジョンとしたものを同様に投与した。これと同じ投与を2週間間隔で6回実施し、最終投与の1週間後に全採血を行ない、抗血清を調製した。

#### 【0078】

ウサギ血清からの抗FGF-23部分ペプチド抗体を精製するためのアフィニティカラムを作製するために、免疫に用いたそれぞれのペプチドをSulfoLink Kit (米国、PIERCE社) を用いてゲル上に固相化した。吸着緩衝液としてPBS(-)を用いて抗血清をこのカラムに添加し、免疫に用いたペプチドと結合する抗体をカラムに保持した。次に溶出緩衝液として0.1 M グリシン緩衝液 (pH 2.5-3.3) を用いてカラムに結合した抗体を溶出させ、回収した。溶出画分は1 M Tris-HCl を添加してpH7.2 付近に調整した。このように調製した抗体溶液を、ゲルろ過カラムNA P25(米国、Amersham Pharmacia Biotech社)に供してPBS(-)に緩衝液を置換した後、孔径0.22  $\mu$ m のメンブランフィルターMILLEX-GV (米国、Millipore社) でろ過滅菌し、各ペプチドに対する抗体を得た。精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出した。このようにして得られた各精製抗体を、免疫に用いたペプチドの名前を用いて示すことにする。例えば配列番号9のhFGF23-25ペプチドを免疫して得られた抗体に関してはhFGF23-25抗体と記載することにする。

#### 【0079】

### (3) 抗FGF-23部分ペプチド抗体によるFGF-23蛋白質およびその代謝物の認識

上述の方法により取得したhFGF23-48抗体とhFGF23-148抗体を用いてCHO-FGF23H発現細胞上清中のFGF-23H蛋白質およびその代謝物をウェスタンブロッティングにて解析した。図1Aに示すように、いずれの抗体でも32 kDa付近の全長FGF-23H蛋白質が検出された。また18 kDa付近以下の大きさの代謝物が認められたが、これはFGF-23蛋白質が配列番号1に示すアミノ酸配列番号の179番目と180番目の間で切断されて生じたN末側の断片に由来すると考えられる。hFGF23-48抗体では、より小断片化した代謝物を認識していた。また、179番目と180番目の間での切断を回避する変異蛋白質を産生するCHO-FGF23RQの培養上清中のFGF-23RQ蛋白質と

その代謝物に関してhFGF23-148抗体を用いて検討した。図1Cに示すようにFGF-23 Hで認められていた断片化ペプチドは検出されなくなった。以上のことからFGF-23蛋白質の蛋白切断による代謝は、179番目と180番目の間が切断されることにより生じたN末断片はさらに小断片化していくが、このような小断片は179番目と180番目の間での切断が生じたのちに生成され则认为られた。従ってFGF-23蛋白質の代謝を考える上で179番目と180番目の間での切断の有無を見分けることが非常に重要であることが判明した。

#### 【 0 0 8 0 】

##### (実施例 6) ビオチン化抗体の作製

上述の精製した9種のFGF-23部分ペプチドに対するポリクローナル抗体および13種の抗FGF-23モノクローナル抗体の一部を用いてビオチン化を行った。50 mM炭酸水素ナトリウム溶液で1 mg/mlの濃度に希釈した抗体溶液1 mlに、Biotin-AC5-0su(日本、同仁化学社)をジメチルホルムアミドに1.82 mg/mlの濃度で溶解した溶液を10  $\mu$ l添加し、4℃において2時間転倒混和した。その後、この反応液をNAP 10カラム(米国、Amersham Pharmacia Biotech社)に供し、未反応のBiotin-AC5-0suを除き、溶媒をPBS(-)に置換した。9種類のビオチン標識抗FGF-23部分ペプチドポリクローナル抗体および5種のビオチン標識抗FGF-23モノクローナル抗体を得た。

#### 【 0 0 8 1 】

##### (実施例 7) FGF-23の特定部位を認識するポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法

##### (1) サンドイッチELISA系の構築

上述のFGF-23の部分ペプチド配列に対する9種類のポリクローナル抗体のうち、8種類の抗体(hFGF23-25抗体、hFGF23-48抗体、hFGF23-114抗体、hFGF23-148抗体、hFGF23-170抗体、hFGF23-180抗体、hFGF23-210抗体およびhFGF23-237抗体)を固相化用抗体および検出用抗体として組み合わせて、サンドイッチELISA系の構築を検討した。

#### 【 0 0 8 2 】

抗体を固相化するために、抗FGF-23部分ペプチドポリクローナル抗体8種(hFG

F23-25抗体、hFGF23-48抗体、hFGF23-114抗体、hFGF23-148抗体、hFGF23-170抗体、hFGF23-180抗体、hFGF23-210抗体およびhFGF23-237抗体)を50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で30  $\mu$ g/mlとなるよう希釈し、96ウェルELISA用プレート (Maxisorp (登録商標)、米国、Nunc社))に1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、37°Cで1.5時間静置した。その後、反応液を除去し、(SuperBlock (登録商標)、米国、PIERCE社)を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え室温で60分間インキュベートしてブロッキングを行った。溶液を除去した後、1  $\mu$ g/mlのFGF-23H蛋白質を、1ウェルあたり50  $\mu$ lずつ加え、室温で1時間静置して固相化した抗体と結合させた。抗体反応後、T-TBSで3回洗浄した後、10 % Blockace(日本国、大日本製薬社)を含むT-TBSで10  $\mu$ g/mlに希釈した上述のビオチン標識した抗FGF-23部分ペプチド抗体8種 (hFGF23-25抗体、hFGF23-48抗体、hFGF23-114抗体、hFGF23-148抗体、hFGF23-170抗体、hFGF23-180抗体、hFGF23-210抗体、hFGF23-237抗体) および対照として10 % Blockace(日本国、大日本製薬社)を含むT-TBS溶液をそれぞれ1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で30分間静置し二次抗体反応をおこなった。各ウェルをT-TBSで3回洗浄した後、10 % Blockaceを含むT-TBSで5000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン (デンマーク、DAKO社)を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で30分間静置してビオチン標識抗体と結合させた。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン (デンマーク、DAKO社)を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で15分間発色させた後、0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えることにより反応を停止させた。測定は96穴プレート用の吸光度測定装置MTP-300 (日本、コロナ電気社)を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値を求めた (表2)。ビオチン標識抗体を加えていない対照では450 nm-570 nm値は全て0.06以下であったが、表2に示すように、複数の固相化抗体、検出抗体の組み合わせにおいて顕著に450 nm-570 nm値が上昇していた。図1に示すように、FGF-23蛋白質の切断により生じるポリペプチドの存在が知られており、同一試料中にFGF-23に由来する異なる分子種のポリペプチドが存在することが考えられる。ここで用いている抗体は、FGF-23の特定の部位を認識することから、抗体の組み合わせに従って、測定対象の分子種を絞り込むことができる。例えばhFGF23-170抗体を固相化し、hFGF23-25抗体で検出する組み合わせを

用いた場合は、両抗体の抗原部位が配列番号1に示すFGF-23蛋白質アミノ酸配列の25-179残基のN末側部分ポリペプチド断片に含まれるため、これらの組み合わせによるサンドイッチELISAでは配列番号1の25-251残基の全長ポリペプチドを検出できるのみならず、そのN末部分ポリペプチド断片も検出できると予想される。一方、hFGF23-180抗体を固相化しhFGF23-237抗体で検出すると、全長ポリペプチドのみならず配列番号1で示すFGF-23蛋白質の180-251残基に相当するC末側部分ポリペプチド断片を検出できると予想される。また、例えば、hFGF23-237抗体を固相化しhFGF23-25抗体で検出すると切断後のNおよびC末側部分ポリペプチドを検出することなく全長のFGF-23蛋白質のみを検出できると予想される。したがって、これらの組み合わせを複合的に用いることにより、生体試料等の検体中のFGF-23全長ポリペプチドと部分ポリペプチドの絶対量の測定と存在比の識別が可能となる。

【0083】

【表2】

抗 FGF-23 ポリクローナル抗体の組み合わせによるサンドイッチ ELISA による FGF-23 蛋白質の検出 (A450 nm-A570 nm)。

	固相化抗体							
	hFGF23-25	hFGF23-48	hFGF23-114	hFGF23-148	hFGF23-170	hFGF23-180	hFGF23-210	hFGF23-237
ビオチン化抗体								なし
hFGF23-25	0.517	0.046	0.040	0.050	1.543	1.938	0.686	1.808
hFGF23-48	0.037	0.050	0.028	0.028	0.030	0.033	0.031	0.034
hFGF23-114	0.033	0.026	0.029	0.026	0.027	0.029	0.026	0.029
hFGF23-148	0.091	0.070	0.046	0.140	0.157	0.102	0.083	0.104
hFGF23-170	0.444	0.035	0.033	0.068	0.112	0.054	0.041	0.057
hFGF23-180	0.370	0.036	0.034	0.042	0.045	0.193	0.286	0.652
hFGF23-210	0.309	0.034	0.033	0.036	0.043	0.563	0.065	0.383
hFGF23-237	1.096	0.061	0.047	0.081	0.113	2.143	0.407	0.442

横が固相化抗体の種類、縦が検出抗体の種類を表し、各組み合わせで得られた測定値を示す。

【0084】

## (2) サンドイッチELISAによるFGF-23蛋白質の定量的検出

上述のサンドイッチELISA系作製方法に従い、hFGF23-25抗体を固相化し、検出用抗体としてhFGF23-237抗体を用いて、1、0.33、0.1、0.033、0.01、0.0033および0.001  $\mu\text{g/ml}$ の濃度のFGF-23H蛋白質溶液を被験物質として測定を実施した

。その結果を図2に示す。0.1~1  $\mu$ g/mlの範囲内で濃度依存的な450 nm-570 nm値の上昇が得られたことから、少なくともこの濃度範囲におけるFGF-23H蛋白質を濃度依存的に検出可能であることが判明した。

#### 【0085】

##### (実施例8) FGF-23部分ペプチドの作製

実施例5で作製したFGF-23の部分配列に相当するペプチドのほかに以下の配列を有するFGF-23の部分配列を有するペプチドを化学合成した。配列番号1の残基番号38番目グリシンから始まる13個のアミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したhFGF23-38(配列番号18)、配列番号1の残基番号68番目トレオニンから始まる28個のアミノ酸残基からなるペプチドhFGF23-68(配列番号19)、配列番号1の残基番号96番目メチオニンから始まる18個のアミノ酸残基からなるペプチドhFGF23-96(配列番号20)、配列番号1の残基番号129番目セリンから始まる22個のアミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したhFGF23-129(配列番号21)、配列番号1の残基番号161番目アルギニンから始まる13個のアミノ酸残基からなるペプチドのC末端にシステイン残基を付加したhFGF23-161(配列番号22)、配列番号1の残基番号197番目アラニンから始まる16個のアミノ酸残基からなるペプチドhFGF23-197(配列番号23)および配列番号1の残基番号220番目セリンから始まる24個のアミノ酸残基からなるペプチドhFGF23-220(配列番号24)。

#### 【0086】

hFGF23-38: GLIHLYTATARNSC (配列番号18)  
 hFGF23-68: TIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLC (配列番号19)  
 hFGF23-96: MDFRGNIFGSHYFDPENC (配列番号20)  
 hFGF23-129: SPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNC (配列番号21)  
 hFGF23-161: RNEIPLIHFNTPIC (配列番号22)  
 hFGF23-197: ARMT PAPASCSQELPS (配列番号23)  
 hFGF23-220: SDPLGVVRGGRVNT HAGGTGPEGC (配列番号24)

#### 【0087】

##### (実施例9) モノクローナル抗体のFGF-23認識領域の決定

抗FGF-23モノクローナル抗体が認識するアミノ酸配列を含む領域をヒトFGF-23の部分配列を含むペプチドとの反応性を調べて決定した。

#### (1) 固相化ペプチドとの結合実験1

実施例5で合成したペプチド（配列番号7～17）を50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で1  $\mu$ g/mlとなるよう希釈し、96ウェルELISA用プレート（Maxisorp（登録商標）、米国、Nunc社）に1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、37℃で1時間静置してFGF-23部分ペプチドを固相化した。その後、溶液を除去してブロッキング溶液（Superblock（登録商標）、米国、PIERCE社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて室温で60分間インキュベートしてブロッキングを行った。溶液を除去した後、実施例3で取得したハイブリドーマの培養上清、または対照としてHT含有DMEM培地を1ウェルあたり50  $\mu$ lずつ加え、室温で1時間静置することでFGF-23部分ペプチドと結合させた。抗体結合反応終了後にT-TBSで3回洗浄した後、10%のブロッキング溶液（Blockace（登録商標）、日本、大日本製薬社）を含むT-TBSで3000倍に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)-F(ab')<sub>2</sub>を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で30分間静置して二次抗体を結合させた。各ウェルをT-TBSで3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン（デンマーク、DAKO社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で3分間発色させた後、0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えることにより反応を停止させた。測定は96穴プレート用の吸光度測定装置（MTP-300、日本、コロナ電気社）を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値を求めた。対照としてHT含有DMEM培地のみを加えた場合の450 nm-570 nm値は全て0.06以下であったが、ハイブリドーマ培養上清を添加したものにおいて、特定のペプチドを固相化したもので明らかな吸光度値の上昇を認めた。その結果を表3に示す。2A2B抗体は配列番号12のhFGF23-148ペプチドに結合した。1D6Aは配列番号17のhFGF23-237ペプチドとの結合を示した。よってハイブリドーマ2A2Bの産生する抗体は配列番号1に示すFGF-23の148から163番目に示す領域あるいはその一部に結合すると考えられる。さらに1C3Hは配列番号1に示すFGF-23の180から194番目に示す領域あるいはその一部と結合し、1D6Aは配列番号1に示すFGF-23の237から251番目に示す領域あるいはその一部に結合すると考えられる。



【0088】

【表3】

固相化した FGF-23 の部分配列を持つペプチドとモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清中の抗体との反応性。

	固相化ペプチド							
	hFGF23-25	hFGF23-48	hFGF23-114	hFGF23-148	hFGF23-170	hFGF23-180	hFGF23-210	hFGF23-237
培養上清								
1C3H	0.053	0.043	0.043	0.041	0.037	0.240	0.039	0.036
1D6A	0.056	0.051	0.049	0.045	0.044	0.040	0.038	2.058
2A2B	0.052	0.048	0.043	2.321	0.040	0.037	0.036	0.040
2C3B	0.056	0.046	0.043	0.038	0.039	0.038	0.041	0.041
Control	0.059	0.047	0.048	0.051	0.043	0.044	0.045	0.043

【0089】

## (2) 固相化ペプチドとの結合実験2

FGF-23は、配列番号1に示す配列の179番目と180番目の間での切断が認められるが、この切断部位よりC末側を認識する抗体について詳細に検討する目的で、この領域の一部に相当する配列を持つ合成ペプチドを用いた結合実験を実施した。実施例5で合成したペプチド（配列番号14、15、16および17）および実施例8で合成したペプチド（配列番号23および24）を50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で1  $\mu\text{g/ml}$ となるよう希釈し、96ウェルELISA用プレート（Maxisorp（登録商標）、米国、Nunc社）に1ウェルあたり50  $\mu\text{l}$ 加え、4℃で12時間静置してプレート上に固相化した。その後、溶液を除去し、ブロッキング溶液（Superblock（登録商標）、米国、PIERCE社）を1ウェルあたり50  $\mu\text{l}$ 加え、室温で60分間インキュベートしてブロッキングを行った。溶液を除去した後、実施例3および実施例4で精製、取得した1D6A抗体、3C1E抗体を10%のブロッキング溶液（Blockace（登録商標）、日本、大日本製薬社）を含むT-TBSで10  $\mu\text{g/ml}$ になるように希釈した溶液を1ウェルあたり50  $\mu\text{l}$ ずつ加えた。対照として10%のブロッキング溶液（Blockace（登録商標）、日本、大日本製薬社）を含むT-TBSを50  $\mu\text{l}$ 加えたウェルを設定した。これを室温で1時間静置することで固相化したペプチドと抗体を反応させた。抗体反応後、T-TBSで4回洗浄した後、10%のブロッキング溶液（Blockace（登録商標）、日本、大日本製薬社）を含むT-TBSで3000倍に希釈したHRP標識ヤギ

抗マウスIgG(H+L)-F(ab')<sub>2</sub>を1ウェルあたり50  $\mu$ lずつ加え、室温で60分間静置し二次抗体を反応させた。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン（デンマーク、DAKO社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で20分間発色させた後、0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えることにより反応を停止させた。測定は96穴プレート用の吸光度測定装置（MTP-300、日本、コロナ電気社）を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値を求めた。この結果を表4に示す。対照として希釈用液のみを加えたウェルの450 nm-570 nm値は全て0.05以下であった。これに対して3C1E抗体はペプチドhFGF23-180（配列番号15）と結合し、1D6A抗体はペプチドhFGF23-237（配列番号17）結合した。

【0090】

【表4】

固相化したFGF-23の部分配列を持つペプチドと精製したモノクローナル抗体との反応性。

	固相化ペプチド							Control
	hFGF23-170	hFGF23-174	hFGF23-180	hFGF23-197	hFGF23-210	hFGF23-220	hFGF23-237	
精製抗体								
1D6A	0.041	0.051	0.047	0.050	0.055	0.054	3.412	0.060
3C1E	0.037	0.043	0.203	0.041	0.040	0.051	0.042	0.045
Control	0.038	0.041	0.035	0.036	0.042	0.048	0.043	0.048

【0091】

（実施例10） 免疫沈降によるFGF-23蛋白質およびそれに由来するポリペプチドの検出

固相化ペプチドに比べて、より生理的条件に近い液相において、取得したモノクローナル抗体とFGF-23蛋白質およびそれに由来するポリペプチドとの反応性を明らかにするため、免疫沈降を実施し、沈降蛋白質をウェスタンブロッティングで検出した。

【0092】

実施例2で作製したFGF-23Hを発現するCHO-FGF23細胞をCHO-S-SFM II培地（米国、Gibco BRL社）で4日間培養し、FGF-23蛋白質、N末側ポリペプチド断片およ

びC末側ポリペプチド断片を含む培養上清を得た。この上清400  $\mu$ lあたり実施例3および実施例4で作製した5種の抗FGF-23モノクローナル抗体を0.5  $\mu$ g添加した溶液を調製した。緩衝液のみを添加したものを実験対照とした。この溶液を4℃で1.5時間転倒混和し、抗体と培養上清中の蛋白質を反応させた。その後、プロテインG Sepharose 4FFレジン (米国、Amersham Pharmacia Biotech社) を30  $\mu$ l添加し、4℃で3時間転倒混和した後、レジンに結合しなかった物質をPBSで3回洗い流した。このレジンの半分量に対して、30  $\mu$ lの20 mM DTT含有および非含有サンプルバッファー (50 mM Tris-Cl pH6.8、1 % SDS、10 %グリセロール、0.001%ブロムフェノールブルー、2 mM EDTA) を添加し、95℃で5分間加熱した後に遠心して上清を回収した。このように回収された免疫沈降物を10-20%の濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、セミドライプロットティング装置 (米国、Owl Separation Systems社) を用いて、ゲル中の蛋白質をImmobilon PVDF膜 (米国、Millipore社) に転写した。ブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) でこのPVDF膜をブロッキングした後、T-TBSで1  $\mu$ g/mlに希釈したビオチン標識した2A2B抗体または1C3H抗体溶液中で4℃で12時間インキュベーションした。さらにHRP標識ストレプトアビジン (デンマーク、DAKO社) を反応させ、洗浄後、ECLプラス発光システム (米国、Amersham Pharmacia Biotech社) を用いてフィルムに1時間露光し、自動現像機 (日本、フジフィルム社) で現像した。その結果を図3に示す。ウエスタンブロットティングで用いた2A2B抗体は、配列番号1のアミノ酸残基番号148~163番目に相当する部位を認識する抗体である。また、ここで用いた1C3H抗体は、配列番号1の180~194番目に相当する部位を認識する抗体であることが判明しているものである。両者を用いることで179番目と180番目の切断で生じる断片化ポリペプチドを区別して認識することができる。従って本実験の結果よりモノクローナル抗体は以下の3種類の抗体に分類された。すなわち①配列番号1のアミノ酸残基25~179番目に相当するN末側断片ポリペプチド内に認識配列を持ち、かつN末側断片ポリペプチドおよびFGF-23全長蛋白質と免疫複合体を形成する2C3B抗体、②配列番号1のアミノ酸残基180~251番目に相当するC末側断片ポリペプチドに認識配列を持ち、かつC末側断片ポリペプチドおよびFGF-23全長蛋白質と免疫複合体を形成する2種類の抗体 (1D6A抗体

と3C1E抗体)、および③免疫沈降物が検出できなかった抗体(2A2B抗体)である。

#### 【 0 0 9 3 】

(実施例 1 1) 抗FGF-23モノクローナル抗体と抗FGF-23ポリクローナル抗体を用いたELISAによるFGF-23蛋白質の検出

2種類のモノクローナル抗体(1D6A抗体、2C3B抗体)をそれぞれ固相化し、実施例7で検出抗体として有用性が示された5種類のポリクローナル抗体(hFGF23-25抗体、hFGF23-170抗体、hFGF23-180抗体、hFGF23-210抗体およびhFGF23-237抗体)をそれぞれ検出抗体に用いたサンドイッチELISA系で精製したFGF-23蛋白質の検出を行った。

#### 【 0 0 9 4 】

プロテインGアフィニティカラムで精製した上述の2種のモノクローナル抗体を50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で10  $\mu$ g/mlとなるよう希釈し、96ウェルELISA用プレート(Maxisorp(登録商標)、米国、Nunc社)に1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、37℃で1時間静置して固相化した。その後、反応液を除去し、ブロッキング溶液(SuperBlock(登録商標)、米国、PIERCE社)を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で30分間インキュベートし、ブロッキングを行った。溶液を除去し、Tween20を0.05%含有するPBS(T-PBS)で3回洗浄した後、それぞれ実施例2で作製された0.1  $\mu$ g/mlの濃度のFGF-23H蛋白質精製物、N末側断片ポリペプチド精製物、C末側断片ポリペプチドにHis6 tagが付加された精製物の溶液を1ウェルあたり50  $\mu$ lずつ加え、室温で2時間静置して固相化した抗体と反応させた。抗体反応後、T-PBSで3回洗浄した後、10%のブロッキング溶液(Blockace(登録商標)、日本、大日本製薬社)を含むT-TBSで2.5  $\mu$ g/mlに希釈した5種のビオチン標識抗FGF-23部分ペプチドポリクローナル抗体(hFGF23-25抗体、hFGF23-170抗体、hFGF23-180抗体、hFGF23-210抗体、hFGF23-237抗体)を室温で30分間インキュベートして二次抗体反応をおこなった。各ウェルをT-PBSで3回洗浄した後、10%のブロッキング溶液(Blockace(登録商標)、日本、大日本製薬社)を含むT-TBSで5000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン(デンマーク、DAKO社)を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で30分間静置してビオチン標識抗体と結合させた。各ウェルを

T-TBSで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン（デンマーク、DAKO社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて室温でインキュベートした。7分後に0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて反応を停止させた。測定は96ウェルプレート用の吸光度測定装置（MTP-300、日本、コロナ電気社）を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値を求めた。その結果を図4に示す。抗体を加えていない対照の450 nm-570 nm値は全て0.015以下であったが、固相化抗体と検出抗体の組み合わせに応じて、それぞれFGF-23全長蛋白質（図4A）、N末側断片ポリペプチド（図4B）またはC末側断片ポリペプチド（図4C）に特異的な反応が観察された。この反応性の違いにより抗FGF-23モノクローナル抗体の認識部位を確認することができた。すなわち2C3B抗体を固相化した場合、3種類のビオチン化ポリクローナル抗体（hFGF23-180抗体、hFGF23-210抗体、hFGF23-237抗体）を検出抗体として使用する組み合わせにおいて全長FGF-23蛋白質は検出されたが、N末側断片ポリペプチドまたはC末側断片ポリペプチドは検出されなかった。一方、N末側断片ポリペプチドを認識するビオチン標識ポリクローナル抗体（hFGF23-25抗体、hFGF23-170抗体）で全長FGF-23蛋白質とN末側断片ポリペプチドが強く検出されたが、C末側断片ポリペプチドは全く検出されなかった。このことから、2C3B抗体はN末側断片ポリペプチドを認識することが確かめられた。1D6A抗体を固相化した場合、N末側断片ポリペプチドを認識するポリクローナル抗体を検出抗体として用いることで全長蛋白質が検出されたが、N末断片およびC末側断片ポリペプチドは全く検出されなかった。一方でC末側断片ポリペプチドを認識するポリクローナル抗体を検出抗体として用いて全長蛋白質およびC末側断片ポリペプチドの検出を行うと、1D6A抗体はhFGF23-180との組み合わせで検出が可能であった。本結果は、1D6A抗体はポリクローナル抗体hFGF23-237抗体と競合する事を示しており、1D6A抗体は配列番号1のアミノ酸残基237～251番目の領域を認識することが確かめられた。

【 0 0 9 5 】

（実施例12） 抗FGF-23モノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチELISAによるFGF-23蛋白質の検出

実施例3と実施例4で取得した4種類の抗FGF-23モノクローナル抗体を固相化し

、実施例6で調製した4種のビオチン標識抗FGF-23モノクローナル抗体を検出抗体として用いるサンドイッチELISAを実施し、精製したFGF-23蛋白の検出を行った。

#### 【0096】

4種類のFGF-23モノクローナル抗体（1D6A抗体、2A2B抗体、2C3B抗体、3C1E抗体）を50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で10  $\mu$ g/mlとなるよう希釈し、96ウェルELISA用プレート（Maxisorp（登録商標）、米国、Nunc社）に1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、4℃で12時間静置して固相化した。その後、反応液を除去し、ブロッキング溶液（SuperBlock（登録商標）、米国、PIERCE社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で20分間インキュベートし、ブロッキングを行った。溶液を除去し、Tween 20を0.1%含有するTBS（T-TBS）で3回洗浄した後、0.1  $\mu$ g/mlの濃度の FGF-23 蛋白質精製物を1ウェルあたり50  $\mu$ lずつ加え、室温で1時間静置して固相化抗体と反応させた。抗体反応後、T-TBSで4回洗浄した後、10%のブロッキング溶液（Blockace（登録商標）、日本、大日本製薬社）を含むT-TBSで10  $\mu$ g/mlに希釈した3種類のビオチン標識抗FGF-23モノクローナル抗体（1D6A抗体、2C3B抗体、3C1E抗体）を添加して、室温で1時間静置して二次抗体反応をおこなった。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、10 %のブロッキング溶液（Blockace（登録商標）、日本、大日本製薬社）を含むT-TBSで5000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン（デンマーク、DAKO社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で20 分間静置してビオチン標識抗体と結合させた。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン（デンマーク、DAKO社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて室温でインキュベートした。30分後に0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて反応を停止させた。測定は96ウェルプレート用の吸光度測定装置（MTP-300、日本、コロナ電気社）を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値を求めた。その結果を表6に示す。固相化抗体または検出抗体を加えていない対照の450 nm-570 nm値は全て0.033以下であったが、固相化抗体と検出抗体の組み合わせに応じて吸光度の上昇が認められた。例えば配列番号1に示すFGF-23蛋白質アミノ酸配列中の25～179番目の領域中に認識部位を有する2C3B抗体を固相化抗体とし、配列番号1に示すFGF-23蛋白質アミノ酸配列中の180

～251番目の領域中に認識部位を有するビオチン標識した1D6A抗体3C1E抗体を検出抗体とした組み合わせのサンドイッチELISAを行なった場合、450 nm-570 nm値は全て2.9以上という高値を示した。配列番号1に示すFGF-23蛋白質アミノ酸配列の179番目のアルギニンと180番目のセリンの間で切断されて生じた断片化ポリペプチドは、このようなサンドイッチELISAの測定対象から除外されるため、このような抗体の組み合わせを用いることでN末側ポリペプチド断片やC末側ポリペプチド断片を認識することなく、切断されていないFGF-23蛋白質を高感度に検出することができる。実施例2で精製した全長FGF-23H蛋白質、N末側ポリペプチド断片、C末側ポリペプチド断片を既報の方法と同様にマウスに投与したところ血清リンの低下誘導は全長FGF-23H蛋白質にのみ認められた。このことより、配列番号1に示すFGF-23蛋白質アミノ酸配列の179番目のアルギニンと180番目のセリンの間での切断は、FGF-23蛋白質の活性を大きく変化させることが明らかとなった。ここで示した切断されたポリペプチドを除外して切断されていないFGF-23蛋白質を選択的に検出する方法は試料内に含まれる活性を有するFGF-23をよりの確に検出および測定することを可能にするものである。一方、配列番号1に示すFGF-23蛋白質アミノ酸配列中の180～251番目の領域中に認識部位を有する1D6A抗体、3C1E抗体を固相化抗体とし、さらに検出抗体としてもビオチン標識した1D6A抗体、3C1E抗体を用いた場合、同様に抗体の競合から配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸残基180～194番目の領域を認識する3C1E抗体のグループと配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸残基237～251番目の領域を認識する1D6A抗体は異なる認識部位を持つことが明らかとなった。またこれらの抗体を組み合わせることによって、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸残基25～179番目の領域内に位置するポリペプチド断片を除外し、且つ、180～251残基のC末側断片ポリペプチドを高感度良く検出できる測定法の確立することができることが明らかとなった。

【0097】

【表 5】

抗 FGF-23 モノクローナル抗体とそのビオチン化抗体をそれぞれ固相化抗体と検出抗体として組み合わせたサンドイッチ ELISA で FGF-23 蛋白質の検出を行った場合の吸光度値。

	固相化抗体			
	1D6A	2C3B	3C1E	なし
検出抗体				
1D6A	0.038	3.469	3.131	0.015
2C3B	1.287	0.466	>3.5	0.015
3C1E	1.549	>3.5	0.058	0.033
なし	0.020	0.024	0.023	0.022

## 【 0 0 9 8 】

(実施例 1 3) 抗 FGF-23 モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による FGF-23 蛋白質の定量的測定

2C3B 抗体を 50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で 10  $\mu$ g/ml に希釈したものを 96 ウェル ELISA 用プレート (Maxisorp (登録商標)、米国、Nunc 社) に 1 ウェルあたり 50  $\mu$ l 加え、4°C で 12 時間静置して固相化した。その後、反応液を除去し、ブロッキング溶液 (SuperBlock (登録商標)、米国、PIERCE 社) を 1 ウェルあたり 250  $\mu$ l 加え、室温で 30 分間インキュベートし、ブロッキングを行った。溶液を除去し、Tween20 を 0.1% 含有する TBS (T-TBS) で 2 回洗浄した。これに、実施例 2 で精製した FGF-23 蛋白質を 10% のブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) を含む T-TBS で 10、3、1、0.3、0.1、0.03、0.01 および 0.003 ng/ml となるように希釈した各溶液を 1 ウェルあたり 50  $\mu$ l ずつ加え、室温で 1 時間静置して固相化抗体と反応させた。抗体反応後、T-TBS で 4 回洗浄した後、10% のブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) を含む T-TBS で 10  $\mu$ g/ml に希釈した 2 種類のビオチン標識抗 FGF-23 モノクローナル抗体 (1D6A 抗体および 3C1E 抗体) を添加して、室温で 30 分間静置し二次抗体反応をおこなった。各ウェルを T-TBS で 4 回洗浄した後、10 % のブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) を含む T-TBS で 5000 倍に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (デンマーク、DAKO 社) を 1 ウェルあたり 50  $\mu$ l 加え、室温で 30 分間静置してビ



オチン標識抗体と結合させた。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン（デンマーク、DAKO社）を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて室温でインキュベートした。25分後に0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて反応を停止させた。測定は96ウェルプレート用の吸光度測定装置（MTP-300、日本、コロナ電気社）を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値を求めた。その結果を図6に示す。少なくとも0.03 ng/mlの濃度のFGF-23蛋白質が存在することで有意な測定値の上昇が観察され、3 ng/ml程度までの範囲内で濃度依存的な450 nm-570 nm値の上昇が得られ、この濃度範囲におけるFGF-23蛋白質の検出が可能であることが明らかとなった。

## 【0099】

## （実施例14） 抗FGF-23モノクローナル抗体固定化カラムの作製

FGF-23蛋白質の免疫沈降による回収やFGF-23蛋白質の精製用の抗体カラムとして有用な抗FGF-23抗体を固定化したカラムを市販の固定化試薬（SulfoLink（登録商標）、米国、PIERCE社）を用いて作製した。5 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液（pH6.0）に1C3H抗体、1D6A抗体、および2C3B抗体を希釈し、それぞれ、1 mg/ml、1 mg/mlおよび0.4 mg/mlの濃度の溶液を調製した。この抗体溶液1 mlに対して、6 mgの2-メルカプトエタノールアミンを添加し37℃で1時間転倒混和して還元反応により抗体内のジスルフィド結合を解離させた。NAP10カラム（米国、Amersham Pharmacia Biotech社）を用いてバッファーを1.5 mlの結合バッファー（50 mM Tris-HCl, pH8.5、5 mM EDTA）溶液に交換しするとともに2-メルカプトエタノールアミンを除き還元反応を停止させた。これらの抗体溶液を予め結合バッファーで洗浄した1 mlのSulfoLink（登録商標） coupling gel（米国、Pierce社）に添加し室温で30分転倒混和し結合反応を行った。遠心分離後、レジンを結合バッファーで洗浄し、未反応チオール基のブロッキングのため、1 mLの0.05 mMのL-システイン-HCl溶液を添加して室温30分転倒混和した。その後、1 M NaClを用いてレジンを洗浄して未反応の抗体およびL-システインを除去した。

## 【0100】

（実施例15） CHO-FGF23H細胞移植マウスの血清中に存在するFGF-23蛋白質の免疫沈降法による検出

血中でのFGF-23蛋白質の存在様態を調べるためFGF-23Hを発現する細胞をヌードマウスに移植し、この細胞より血中に分泌されたFGF-23H蛋白質を免疫沈降法で検出した。1匹のBalb/cヌードマウスに対して $2 \times 10^7$ 個のCHO-FGF23H細胞、あるいは対照としてCHO ras clone-1細胞を皮下に移植し、移植後32日後の時点で細胞が生着して腫瘍を形成したマウスより血清を採取した。5匹のCHO ras clone-1移植マウスおよび6匹のCHO-FGF23H移植マウスより採取した血清をそれぞれ等量ずつ混合し、その150  $\mu$ lの混合血清に対して、実施例14で作製した1D6A抗体、および2C3B抗体をそれぞれ固定化したレジンおよび抗体固定化をしていないレジンをそれぞれ10  $\mu$ l添加し4℃において1時間転倒混和して抗体とFGF-23を反応させた。その後PBSでレジンを3回洗浄し、未反応物を除去した。それぞれのレジンに50  $\mu$ lのサンプルバッファー (50 mM Tris-Cl pH6.8、1 % SDS、10 %グリセロール、0.001%ブロムフェノールブルー、2 mM EDTA、20 mM DTT) を添加し95℃で5分間加熱したのち、遠心分離して得た上清を回収した。これを10-20%勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、セミドライブロットティング装置(米国、Owl Separation Systems社)を用いてゲル中の蛋白質をPVDF膜(米国、Millipore社)に転写した。このPVDF膜をBlockace(登録商標、日本、大日本製薬社)で0.5  $\mu$ g/mlに希釈したビオチン標識した2A2B抗体又は1C3H抗体溶液中で、4℃で12時間インキュベーションした後、さらにHRP標識ストレプトアビジン(デンマーク、DAKO社)を反応させた。これをECLプラス発光システム(米国、Amersham Pharmacia Biotech社)を用いてフィルムに1時間露光し、自動現像機(日本国フジフィルム社)で現像した。その結果を図7に示す。抗体を固定化していないレジンにおいては全くシグナルは観察されなかったが、1C3H抗体で免疫沈降し、2A2B抗体で検出した場合22 kDaのシグナルが検出され、1C3H抗体で検出した場合、22 kDaと10 kDaのシグナルが検出された。また、1D6A抗体で免疫沈降し、2A2B抗体で検出した場合22 kDaのシグナルが検出されず、1C3H抗体で検出した場合、10 kDaのみのシグナルが検出された。さらに2C3B抗体で免疫沈降し、2A2B抗体で検出した場合22 kDaと16 kDaのシグナルが検出され、1C3H抗体で検出した場合、22 kDaのみのシグナルが検出された。2A2B抗体は配列番号1のアミノ酸残基148～163番目の領域を認識し、1C3H抗体は配列番号1のアミノ酸残基180～194番目の領域を認識する

ことが判明している。また2A2B抗体はウエスタンブロッティング法において配列番号1のアミノ酸残基25～179番目に相当するN末側断片ポリペプチドを認識しそのシグナルの大きさは電気泳動上で16 kDaに検出されること、1C3H抗体は配列番号1のアミノ酸残基180～251番目のC末側断片ポリペプチドを認識し、そのシグナルの大きさは10 kDaに検出されることが判明している。本実験で検出された16 kDaのシグナルはN末側断片ポリペプチドを示し、10 kDaのシグナルはC末側断片ポリペプチドを示していることは明らかである。また、マウス血清中より回収された22 kDaのポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸残基25～179番目で示されるN末側領域を認識する2C3B抗体とアミノ酸残基148～163番目の領域を認識する2A2B抗体およびアミノ酸残基180～194番目の領域を認識する1C3Hの産生する抗体で認識することが出来るが、アミノ酸残基237～251番目の領域を認識する1D6A抗体では認識できないものであった。本実験において観察されている22 kDa付近のシグナルはFGF-23蛋白質が切断されて生じたものと考えられ、その切断部位は1C3H抗体が認識する領域よりもC末端側に存在するものである。これまで着目してきた配列番号1に示すアミノ酸番号の179番目のアルギニンと180番目のセリンとの間の切断とは異なる切断とそれにより生じる断片が血清中で認められることが明らかとなった。

#### 【0101】

(実施例16) FGF-23蛋白質の血清中での切断

##### (1) ラット血清と精製FGF-23蛋白質の混和実験

血清によるFGF-23蛋白質の切断について、精製FGF-23蛋白質とラット血清を混和して検討した。20 ngの精製FGF-23蛋白質にラット血清を終濃度で50%になるように添加して混和し、0、0.5、1、2、4、8、24時間インキュベートした。この溶液をポリアクリルアミド電気泳動にて分離し、セミドライブロッティング装置(米国、Owl Separation Systems社)を用いてゲル中の蛋白質をPVDF膜(米国、Millipore社)に転写した。2A2B抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施し、精製FGF-23蛋白質に由来する代謝物を検出した。その結果を図8に示す。血清と混和後、インキュベート時間の増加に伴い、全長FGF-23蛋白質の存在量は減少し、新たに22kDaの断片が出現し、増加することが認められた。

## 【0102】

## (2) ヒト血清および血漿と精製FGF-23蛋白質の混和実験

20 ngの精製FGF-23蛋白質にヒト血清またはヒト血漿を終濃度50%になるように添加して37℃で3時間インキュベートした。この溶液をポリアクリルアミド電気泳動にて分離し、セミドライブロットティング装置(米国、Owl Separation Systems社)を用いてゲル中の蛋白質をPVDF膜(米国、Millipore社)に転写した。2A2B抗体を用いてウエスタンブロットティングを実施し、精製FGF-23蛋白質に由来する代謝物を検出した。その結果を図9に示す。ヒト血清とFGF-23蛋白質を混合した場合には、22kDaのバンドが出現したが、ヒト血漿とFGF-23蛋白質を混合しても22kDaのバンドは認められなかった。従って、22kDaのバンドは血清中に存在する蛋白切断酵素によるものと推定された。

## 【0103】

## (実施例17) FGF-23蛋白質の切断酵素の同定

## (1) トロンビンでのFGF-23の切断

20 ngの精製FGF-23蛋白質にトロンビン(米国、Sigma社)を終濃度1 unit/mlで添加し、3時間インキュベートした。この溶液をポリアクリルアミド電気泳動にて分離し、セミドライブロットティング装置(米国、Owl Separation Systems社)を用いてゲル中の蛋白質をPVDF膜(米国、Millipore社)に転写した。2A2B抗体を用いてウエスタンブロットティングを実施し、精製FGF-23蛋白質に由来する代謝物を検出した。その結果を図10に示す。全長のFGF-23蛋白質は消失し、22kDaのバンドに変換された。

## 【0104】

## (2) 血清によるFGF-23蛋白質の切断に対するヒルジンの阻害作用

血清によるFGF-23の切断への血清中トロンビンの関与について検討する目的でトロンビン選択的阻害剤として知られているヒルジンの影響を検討した。20 ngの精製したFGF-23蛋白質にラットの血清を終濃度50%になるように添加して4時間インキュベートした。また、ラットの血清添加時にヒルジンを1.0 unit/mlで添加して同様にインキュベートした。この溶液をポリアクリルアミド電気泳動にて分離し、セミドライブロットティング装置(米国、Owl Separation Systems社)を

用いてゲル中の蛋白質をPVDF膜(米国、Millipore社)に転写した。2A2B抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施し、精製FGF-23蛋白質に由来する代謝物を検出した。その結果を図11に示す。ラットに血清を添加することでFGF-23蛋白質の一部が22kDaのポリペプチドに変換されたが、ヒルジンを共存させることで22kDaのバンドの出現が抑制された。このことから血清により生じるFGF-23蛋白質の切断はトロンビンまたはトロンビンに類似した酵素によるものであることが示された。

#### 【0105】

##### (実施例18) 血清によるFGF-23蛋白質の切断部位の同定

FGF-23の血清による切断部位を同定するため、10  $\mu$ gの精製FGF-23蛋白質とラットの血清を24時間混和して22kDaのポリペプチドを生成させた。この溶液中の22kDaのポリペプチドを実施例14で作製した抗1C3H抗体カラムに吸着させ、溶出して精製した。ここで用いた抗体カラムは200  $\mu$ gのビオチン化1C3H抗体を500  $\mu$ lのストレプトアビジン固定化レジン(米国、Amersham Pharmacia Biotech社)に吸着させることにより作製した。抗体カラムからのFGF-23由来蛋白質の溶出は、0.1 M グリシン溶液(pH2.7)を用いて行った。このように精製したポリペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、CBB染色を行ない、図12に示すように精製した22kDaポリペプチドを同定した。このバンドを切り出しMALDI-TOF MS解析に供した。それにより得られた分子量より、22kDaのポリペプチドは配列番号1に示すアミノ酸配列の25番目のチロシンから196番目のアルギニンまでの配列を有していることが明らかになった。

#### 【0106】

これらの結果より、FGF-23蛋白質は血清中においては血清中に含まれるトロンビンにより配列番号1に示すアミノ酸配列の196番目に位置するアルギニンの後ろで切断され配列番号1の25～196番目の配列で示されるポリペプチドに変換されることが明らかとなった。血中で活性を有するFGF-23蛋白質の測定には配列番号1のアミノ酸配列の179番目と180番目の間で切断されていないポリペプチドを検出する必要があることを上述したが、活性を有する全長型FGF-23蛋白質が血清サンプル調製の過程で196番目と197番目の間で一部切断を受けることが明らかと

なり、C末端を認識する抗FGF-23モノクローナル抗体ではこの代謝物を認識できないことが判明した。すなわち、配列番号1のアミノ酸配列25～179番目の領域を認識する抗体と配列番号1のアミノ酸配列180～196番目の領域を認識する抗体の組み合わせでサンドイッチELISAを行った場合では、血清化による切断の影響を無視することができるが、配列番号1のアミノ酸配列25～179番目の領域を認識する抗体と配列番号1のアミノ酸配列197～251番目の領域を認識する抗体を用いた場合、血漿中に比べ血清中では測定値が低下する可能性がある。今回取得されてきた抗FGF-23モノクローナル抗体のうち1C3H抗体および3C1E抗体は配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸残基180～194番目の領域を認識する抗体であることから、FGF-23が血清中で切断されて産生された22 kDa蛋白質（配列番号1のアミノ酸配列25-196番目に相当）を配列番号1のアミノ酸配列の179番目と180番目の間で切断により生じるポリペプチド断片と区別して認識することが可能であり、血清サンプルの測定法を作製するにあたり非常に有用な抗体であることが明らかとなった。

## 【0107】

（実施例19） 腫瘍性骨軟化症患者血清および血漿中のFGF-23蛋白質濃度の定量的解析

腫瘍性骨軟化症においては腫瘍でFGF-23が過剰産生されていることが報告されており、この原因腫瘍を取り除くことによって治癒することが知られている。しかしながら、腫瘍性骨軟化症の原因腫瘍は一般に増殖性が低いために腫瘍が小さく発見することが困難である場合が多く、他の低リン血症性疾患との鑑別診断が容易でない。血中のFGF-23濃度が腫瘍性骨軟化症を診断する上での指標となることが実証でき、尚かつ定量的に測定可能な方法が開発されれば臨床上有用である。

## 【0108】

腫瘍性骨軟化症患者の血清および血漿サンプルを入手し、抗FGF-23モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA系にて検体中のFGF-23を定量的に解析することを試みた。抗FGF-23モノクローナル抗体を用いたELISA系は上述の方法を用いた。2C3B抗体を固相化抗体として用い、検出用抗体としてビオチン標識した3C1

E抗体または1D6A抗体を用いた。精製した2C3B抗体を50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で10  $\mu$ g/mlとなるよう希釈し、96ウェルELISA用プレート (Maxisorp (登録商標)、米国、Nunc社)に1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、4℃で12時間静置して固相化した。その後、反応液を除去し、ブロッキング溶液 (SuperBlock (登録商標)、米国、PIERCE社) を1ウェルあたり250  $\mu$ l加え、室温で30分間インキュベートし、ブロッキングを行った。溶液を除去し、Tween20を0.1%含有するTBS (T-TBS) で2回洗浄した。腫瘍性骨軟化症患者血清および血漿サンプルにはマウス抗体への非特異的反応を避けるため、アイソタイプコントロールとして80  $\mu$ g/ml の濃度のマウスIgG1を含むT-TBS溶液で2倍希釈した。また、FGF-23蛋白質への特異的反応を確認するため固相化に用いた抗体2C3B抗体を過剰量 (80  $\mu$ g/ml) 含むT-TBSで2倍希釈したものを調製した。検量線を作成するための標準液は、同様にアイソタイプコントロール抗体を含む溶液で希釈した健常人の血清または血漿に、精製FGF-23蛋白質を0.5、0.25、0.125、0.061、0.031、および0.015 ng/mlの濃度になるように加えて調製した。それぞれのサンプルを1ウェルあたり50  $\mu$ lずつマイクロタイタープレートに加え、室温で1時間静置して検体中のFGF-23蛋白質を固相化抗体と反応させた。抗体反応後、T-TBSで4回洗浄した後、10%のブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) を含むT-TBSで10  $\mu$ g/mlに希釈した2種類のビオチン標識抗FGF-23モノクローナル抗体 (1D6A抗体、3C1E抗体) を添加し、室温で30分間静置して二次抗体反応をおこなった。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、10 %のブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) を含むT-TBSで5000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン (デンマーク、DAKO社) を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で30 分間静置してビオチン標識抗体と結合させた。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン (デンマーク、DAKO社) を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて室温でインキュベートした。30分間後に、0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて反応を停止させた。測定は96ウェルプレート用の吸光度測定装置 (MTP-300、日本、コロナ電気社) を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値を求めた。FGF-23特異的な反応を示す値として、過剰量のアイソタイプコントロール抗体存在下で測定したA450-A570値から過剰量の2C3B抗

体存在下で測定したA450-A570値を減じることにより求めた。その結果を図13に示す。1D6Aを検出抗体に用いた場合、血漿サンプルおよび血清サンプルの測定値はそれぞれ0.033、0.008であり、明らかに血清において血漿よりも低い測定値を示した。一方で、3C1Eを検出抗体として用いた場合では、血清サンプルと血漿サンプルの測定値はほぼ同程度の値を示した。この結果は、実施例18で示した血清中でのFGF-23蛋白質の切断が本サンプルでも一部において生じていることが考えられ、上述のように検出抗体の違いにより臨床サンプルでも測定値の差が出てしまうことが明らかとなった。そこで、血清調製により生じる切断体も測定可能な3C1E抗体を検出抗体として用いてサンドイッチELISAを行い、本患者の腫瘍摘出手術前後に採取された血漿中のFGF-23濃度を測定した。健常人も血漿サンプルに種々の濃度の精製したFGF-23蛋白質を添加した溶液を標準液とし、添加した精製蛋白質量に応じた吸光度の増加に基づき検量線を作成した。このようにして求めた検量線に関して図14Aに示す。2倍希釈したヒト血漿および血清中においても標準液中のFGF-23蛋白質を30 pg/mlの濃度から有意な測定値の上昇として検出し少なくとも500 pg/ml程度までの範囲内で定量に使用できる検量線が得られた。このような条件下で腫瘍性骨軟化症患者より腫瘍摘出手術前日採取した血漿と腫瘍摘出手術後1ヶ月以上経過して採取した血漿サンプル中のFGF-23濃度を定量的に測定した。その結果を図14Bに示す。腫瘍摘出手術摘出前の血漿中には約270 pg/mlのFGF-23蛋白質が存在していたが、手術後に採取したサンプルではFGF-23蛋白質は検出感度（30 pg/ml）以下に低下していた。腫瘍性骨軟化症においては原因腫瘍の存在により測定可能な濃度のFGF-23が血中に存在し、腫瘍の除去により血中のFGF-23濃度が著しく低下することが明確に示された。以上のことから、抗FGF-23モノクローナル抗体を用いたELISAが腫瘍性骨軟化症の診断に有用であるとともに、認識部位を特定した抗体を用いることで血清によるFGF-23の切断の影響も加味して定量的に測定することが示された。

#### 【 0 1 0 9 】

（実施例 2 0） 抗FGF-23モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色

抗FGF-23モノクローナル抗体を用いて腫瘍性骨軟化症原因腫瘍の免疫組織染色を行なった。摘出腫瘍を凍結切片作製用包埋液に浸し液体窒素で冷却したアセト



ンで凍結し、腫瘍凍結ブロックを作製した。また対照として手術時に同時に摘出された腫瘍組織の周辺の正常と思われる組織についても同様に凍結ブロックを作製した。クリオスタット (CM1900、ドイツ、LEICA社) を用いて凍結ブロックを4  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切し、切片をMASコートスライドガラス (日本、松浪ガラス社) 上に冷却乾燥させながら接着させた。このように調製した凍結切片は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。凍結切片を接着させたスライドガラスをアセトン中で室温にて5分間静置し、組織をスライドガラス上に固定した。PBSで洗浄後、1%の過酸化水素、0.1%のアジ化ナトリウムを含有するPBS中で30分間室温にてインキュベートし、内因性のペルオキシダーゼを不活性化した。その後、0.1%のTween20を含有するPBSで洗浄し、4%のスキムミルクを含有するPBS中で30分間室温でインキュベートし、ブロッキングを行なった。その後、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のビオチン標識した1C3H抗体および2C3B抗体を含有するPBSで1時間室温でインキュベートして組織中のFGF-23と添加したモノクローナル抗体を反応させた。0.1%のTween20を含有するPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼキット (Vectastain Elite ABC (登録商標)、米国、VECTOR Laboratories 社) を用いて組織切片に特異的に結合したビオチン標識モノクローナル抗体に西洋ワサビ・ペルオキシダーゼを結合させた。0.1%のTween20を含有するPBSで洗浄後ペルオキシダーゼと基質の反応 (DAKO liquid DAB substrate-chromogen system (登録商標)、デンマーク、DAKO社) を行なった後、PBSで反応を停止させた。脱イオン交換水を用いて洗浄後、ヘマトキシリン・マイヤー (米国、メルク社) を脱イオン交換水で5倍希釈した溶液中で30秒間室温でインキュベートしたのち、流水で洗浄した。その後エタノールを用いて脱水し、キシレンを用いて透徹した後、封入液を用いて封入した。その結果を図15に示す。腫瘍組織においてFGF-23と反応したと考えられる部位が茶色に染色されたが、このような染色像は腫瘍周辺部の組織では観察されなかった。このことから、腫瘍性骨軟化症の原因腫瘍においてFGF-23が高濃度に存在することが確認された。

【0110】

(実施例21) マウスFGF-23蛋白質の発現と精製

マウスのFGF-23配列は既に報告されている (Yamashita, T., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277: 494-498, 2000)。この配列をもとにNCBI遺伝子

配列データベースを検索することで、マウスのFGF-23の配列情報を入手することができる。このようにして得た配列情報をもとに、マウスのFGF-23蛋白質をコードするcDNAを取得するため、Nested PCRを実施した。第一段階の増幅反応に用いるプライマーとしてマウスFGF-23 cDNA配列の5' および3' 非翻訳領域にそれぞれ相補的な配列をもつmF5プライマー（配列番号25）とmF3プライマー（配列番号26）を合成した。マウスの肺由来のcDNA（米国、Clontech社）を鋳型として、LA-Taq DNA polymerase（日本、宝酒造社）を用いて94℃で1分間保温した後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で45秒からなる工程を1サイクルとした30サイクルのPCRを実施した。次に第二段階の反応は、開始コドンから翻訳領域を含む配列番号27に示すmF23Fプライマーと翻訳領域から終始コドンを含む配列番号28に示すmF23Rプライマーを用いて行った。mF23Fプライマーにはクローニング用のEcoRI制限酵素認識配列とKozak配列が導入されている。一方、mF23Rプライマーには、終始コドンのあとにNotI制限酵素認識配列が導入されている。第1段階の反応液を鋳型として、PyroBest DNA polymerase（日本、宝酒造社）を用いて98℃で1分間保温した後、98℃で10秒、58℃で10秒、72℃で60秒からなる工程を1サイクルとした35サイクルのPCRを実施することによりマウスFGF-23蛋白質をコードするcDNA配列を増幅した。このcDNAをpEAK8ベクター（米国、Edge Biosystem社）のEcoRI部位とNotI部位にクローニングした。このベクターをpEAK8mFGF-23と称す。さらに、実施例1で示したFGF-23RQHの作製方法に準じて、マウスFGF-23の切断酵素認識部位のアルギニン残基をグルタミン残基に置換した変異を導入したマウスFGF-23RQを構築した。変異導入は、実施例1の(3)に記載した方法に従って実施した。変異導入用の順方向のmRQFプライマー（配列番号29）と逆方向のmRQRプライマー（配列番号30）を合成した。まず、pEAK8mFGF-23を鋳型としてmF23FプライマーとmRQRプライマーの組み合わせとmF23RプライマーとmRQFプライマーの組み合わせでPCRを行い、それぞれのPCR断片を取得した。次にこの両方の産物を混合して鋳型としてマウスFGF-23 cDNAの両端に位置する mF23FプライマーとmF23RプライマーでPCRを行い変異が導入されたマウスFGF-23 cDNAを増幅した。これをpEAK8/IRES/EGFPプラスミドのEcoRI制限酵素部位とNotI制限酵素部位にクローン化した。これを精製し塩基配列決定を行い、目的の変異を導入したマウスFGF-23cD

NAがクローニングできていることを確認した。これをpEAK8/IRES/EGFP/mFGF-23RQと称す。さらにこのプラスミドをCHO ras clone-1に導入して、 $5\mu\text{g/ml}$ のPuromycin (米国、Sigma社) を添加して薬剤耐性細胞を選択し、クローニングして、マウスFGF-23発現細胞を取得した。この細胞をCHO-mFGF23RQと称す。このCHO-mFGF23RQ細胞をローラーボトルで培養し、約12リットルの培養上清を取得した。これを、実施例2の(3)に記載したFGF-23蛋白質の精製法に従って精製を行い、精製マウスFGF-23RQを取得した。

mF5: ATTAGCCACTCAGTGCTGTGCAATG (配列番号25)

mF3: GCAGCCTGGCCTGGGGACCTA (配列番号26)

mF23F: GGAATTCCACCATGCTAGGGACCTGCCTTAGACTC (配列番号27)

mF23R: ATAGTTTAGCGGCCCTAGACGAACCTGGGAAAGGGGCGACA (配列番号28)

mRQF: TTCGCCACGGCAACACACGCAAAGCGCCGAGGAC (配列番号29)

mRQR: GTCCTCGGCGCTTTGCGTGTGTTGCCGTGGGCGAA (配列番号30)

【0111】

(実施例22) 抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体とFGF-23の反応交差性

精製したマウスFGF-23RQ蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF膜 (米国、Millipore社) に蛋白質を転写し、3C1E抗体でウェスタンブロットティングを実施したところ、図16Aに示すように約32.5 kDaにバンドを検出した。この精製マウスFGF-23RQ蛋白質溶液を段階希釈して、抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAでの検出を試みた。ここで用いたマウスFGF-23RQ蛋白質溶液の濃度は正確には求めているが、濃度が既知の精製ヒトFGF-23蛋白質と並べてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、CBB染色で検出したバンドの濃さから判断したところ、図16Bで相対値10として表したものは、 $1\sim 5\mu\text{g/ml}$ の範囲ではないかと考えられた。2C3B抗体を固相化し、検出用抗体として3C1E抗体を用いて、希釈したマウスFGF-23RQ蛋白質溶液を被験物質として測定を実施した結果を図16Bに示す。精製マウスFGF-23RQ蛋白質の濃度依存的な450 nm-570 nm値の上昇が認められたことから、ここで用いた抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体を用いたELISAでマウスのFGF-23蛋白質を濃度依存的に検出することができることが判明した。また、抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体がマ

ウスFGF-23蛋白質を認識しうることが確認できたことから、実施例27、実施例28で認められた抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体の作用は、マウスの内在性のFGF-23との結合により活性を中和あるいは修飾しているものと考えられた。

#### 【 0 1 1 2 】

(実施例 2 3) 遺伝性低リン血症モデルマウスにおける血中FGF-23蛋白質の検出

FGF-23が腫瘍性骨軟化症の惹起因子であること、またADHRでFGF-23遺伝子のミスセンス変異が認められ、疾患惹起にFGF-23が関連していることが知られている。しかしながら、もう一つの遺伝性低リン血症疾患であるXLHでは、責任遺伝子が解明されているにもかかわらず、その疾患惹起メカニズムはよく分かっていない。また、FGF-23との関連性についても知られていない。この疾患におけるFGF-23の関与を検討する目的でXLHのモデルマウスであるHypマウスの血中FGF-23濃度の測定を試みた。

#### 【 0 1 1 3 】

ELISA実施にあたり2C3B抗体を固相化抗体として用い、検出用抗体としてビオチン標識した3C1E抗体を用いた。精製した2C3B抗体を50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液で10  $\mu$ g/mlとなるよう希釈し、96ウェルELISA用プレート (Maxisorp (登録商標)、米国、Nunc社) に1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、4℃で12時間静置して固相化した。その後、反応液を除去し、ブロッキング溶液 (SuperBlock (登録商標)、米国、PIERCE社) を1ウェルあたり250  $\mu$ l加え、室温で30分間インキュベートし、ブロッキングを行った。溶液を除去し、Tween20を0.1%含有するTBS (T-TBS) で2回洗浄した。27~30週齢のHypマウスおよび同腹より得られた正常な対照マウスより眼窩採血により採取した血清を調製した。これを2C3B抗体またはアイソタイプコントロールであるマウスIgG1抗体を40  $\mu$ g/mlの濃度で含むT-TBSで2倍希釈した。それぞれのサンプルを1ウェルあたり50  $\mu$ lずつマイクロタイタープレートに加え、室温で1時間静置して検体中のFGF-23蛋白質を固相化抗体と反応させた。抗体反応後、T-TBSで4回洗浄した後、10%のブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) を含むT-TBSで2  $\mu$ g/mlに希釈した3C1E抗体を添加し、室温で30分間静置して二次抗体反応をおこなった。各ウェルをT-TBSで4回洗

浄した後、10 %のブロッキング溶液 (Blockace (登録商標)、日本、大日本製薬社) を含むT-TBSで5000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン (デンマーク、DAKO社) を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、室温で30 分間静置してビオチン標識抗体と結合させた。各ウェルをT-TBSで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色基質であるテトラメチルベンジジン (デンマーク、DAKO社) を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて室温でインキュベートした。30分間後に、0.5 M硫酸液を1ウェルあたり50  $\mu$ l加えて反応を停止させた。測定は96ウェルプレート用の吸光度測定装置 (MTP-300、日本、コロナ電気社) を用いて行い、450 nmの吸光度を570 nmの吸光度で減じた値 (A450-A570) を求めた。反応時にアイソタイプコントロール抗体を添加して得たA450-A570値から吸収抗体として用いた2C3B抗体を添加して得たA450-A570値を減じた値をFGF-23特異的反応とした。その結果を図17に示す。図17の結果より、Hypマウスでは血中のFGF-23濃度が著しく上昇していることが明らかである。HypマウスがPHEX遺伝子の欠損による低リン血症を呈することと、ヒトの低リン血症疾患であるXLHがPHEX遺伝子の変異や欠損が原因であることから、HypマウスがXLHのモデルマウスであると考えられている。このことは、XLHにおいて低リン血症惹起因子としてFGF-23血中濃度上昇が存在することが強く示唆される結果である。

#### 【 0 1 1 4 】

(実施例 2 4) FGF-23と1,25Dの相互調節作用

##### (1) FGF-23H投与による1,25Dの低下

6週齢のBALB/c雄マウス 6 匹に精製したFGF-23H蛋白質を一匹あたり5  $\mu$ g尾静脈より投与し、投与後1, 4, 9時間経過したところで採血し、血中の1,25D濃度を測定した。その結果を図18Aに示す。FGF-23Hの投与後3 時間で有意な1,25Dの低下が認められ、9時間ではさらに低下することが見出された。

#### 【 0 1 1 5 】

##### (2) 1,25D投与によるFGF-23の誘導

1,25Dをマウスに投与して血中のFGF-23の変化を検討した。7週齢のBALB/c雄マウス 6 匹を1 群として、0.05% tweenを含むPBS に溶解させた0.025  $\mu$ gの1,25Dを投与する群と、対照としてその媒体である0.05% tweenを含むPBSを投与する

群を設定した。投与は腹腔内に行った。投与後8時間経過したところで、麻酔下で心臓より採血を行い、血清を調製した。このサンプルを実施例23の方法と同じ方法でELISAに供し、ヒトFGF-23蛋白質標準液を用いて作製した検量線を用いて血中のFGF-23量を測定した。その結果を図18Bに示す。1,25Dの投与後8時間で著しい血中FGF-23の上昇が認められた。

以上のことから、FGF-23は、1,25Dと密接な相互調節関係を有することが示された。

#### 【0116】

(実施例25) 腎機能不全高リン血症モデルにおける血中FGF-23濃度

7週齢のWistarラットに0.75%の割合でアデニンを混餌したCE-2（日本、クレア社）を与え、腎機能不全高リン血症モデルを作製した。対照群には、CE-2を与えた。混餌食を与えて3週間目に尾動脈より採血し、血清を採取した。採血後、ラットを代謝ケージ入れて尿を24時間採取した。血清中のリン酸濃度を測定した。この結果を図19Aに示す。血清中および尿中のクレアチニンは、市販のキット（CRE-ENカイノス（登録商標）、日本、カイノス社）を用いた酵素法で測定した。この結果を図19Bに示す。また、2C3B抗体を固相化し、3C1E抗体を検出抗体としたELISA系を用いて血清中のFGF-23濃度を測定した。この結果を図19Cに示す。

#### 【0117】

本モデルにおいて腎機能の障害が進行していることが尿中クレアチニンの低下と血中クレアチニンの上昇から明らかであった。また、それに伴い高リン血症を呈していた。このモデルにおいて血中のFGF-23蛋白質は著しい高値を示した。このモデルは腎不全の一樣態を反映していることが考えられ、FGF-23が腎機能低下や血液透析患者において合併症の惹起因子として作用している可能性を示すものである。

#### 【0118】

(実施例26) 腫瘍性骨軟化症患者血漿中に存在するFGF-23蛋白質の免疫沈降法による検出

血中でのFGF-23蛋白質の存在様態を調べるため健常人血漿または腫瘍性骨軟化症患者血漿より免疫沈降法での検出を行った。400  $\mu$ lの混合血漿に対して、実施

例14で作製した2C3B抗体を固定化したレジンおよび抗体固定化をしていないレジンをそれぞれ20  $\mu$ l添加し、4℃において1時間転倒混和して抗体とFGF-23を反応させた。その後PBSでレジンを4回洗浄し、未反応物を除去した。それぞれのレジンに50  $\mu$ lのサンプルバッファー (50 mM Tris-Cl pH6.8、1 % SDS、10 %グリセロール、0.001%ブロムフェノールブルー、2 mM EDTA、20 mM DTT) を添加し、95℃で5分間加熱したのち、遠心分離して得た上清を回収した。これを10-20%勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、セミドライブロットティング装置(米国、Owl Separation Systems社)を用いてゲル中の蛋白質をPVDF膜(米国、Millipore社)に転写した。このPVDF膜をT-TBS(米国 Sigma社)で0.5  $\mu$ g/mlに希釈したビオチン標識した3C1E抗体溶液中で、室温で2時間インキュベーションした後、さらにHRP標識ストレプトアビジン (デンマーク、DAKO社) を反応させた。これをECLプラス発光システム(米国、Amersham Pharmacia Biotech社)を用いてフィルムに1時間露光し、自動現像機(日本国フジフィルム社)で現像した。その結果を図20に示す。抗体を固定化していないレジンにおいては血漿由来の非特異的なシグナルのみが観察されたが、2C3B抗体で免疫沈降した免疫沈降物に関して、腫瘍性骨軟化症患者血漿では全長型FGF-23と考えられる32kDaにバンドが検出された。また、トロンピンで切断された22kDaのバンドはまったく観察されなかった。一方、健常人では22kD、32kDのバンドともに観察されなかった。これらの結果から、腫瘍性骨軟化症で高発現しているFGF-23は血中では切断を受けずに全長体として存在していることが明らかとなった。

#### 【0119】

(実施例27) 正常マウスにおける抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体投与試験  
抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体の正常マウスへの影響を検討するため、以下の実験を実施した。正常マウス (BALB/c、雄、12週齢) を4匹ずつからなる5つの群に無作為に分別し、図21Aに示すように、第1群には媒体としてPBSを、第2群～第4群には0.67 mg/mlの抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体 (1D6A、2C3B、3C1E) を、また第5群には対照として0.67 mg/mlの抗TP0モノクローナル抗体を、それぞれ0.15 mlずつ尾静脈内に単回投与した。投与から24時間後に、エーテル麻酔下、心採血を実施し、マイクロテイナ(米国 ベクトンディッキンソン社)を用いて血清を

分離した。得られた血清中のリン酸濃度をリン-テストワコー(日本国 和光純薬社)、血清中のカルシウム濃度をカルシウム-テストワコー(日本国 和光純薬社)、血清1,25D濃度を1,25(OH)2D RIAキットTFB(米国 テイエフビー社)をそれぞれ用いて添付の文書に従い測定した。投与から採血までの間、各群毎にプラスチックケージで飼育し、リンおよびカルシウムを1%ずつ含む固形食CE-2(日本国 日本クレア社)および水道水を自由摂取させた。

## 【0120】

得られた結果を図21Aに示す。測定値は各群における平均値 $\pm$ 標準偏差で表されている。\*を付与した群は、student-tにより有意差検定を実施した結果、媒体(PBS)投与群および抗TP0抗体投与群の双方に対し、 $p<0.01$ を示した群を表す。

## 【0121】

## (実施例28)

実施例27で3C1E抗体では血清リン濃度の上昇が認められるにも関わらず、血清1,25D濃度が低下しているという結果が認められたが、血中の1,25D濃度の変化は俊敏であり、1,25D濃度を一過性に上昇させた場合、その後に低値を示すことが知られている。そこで、3C1E抗体の投与試験を再度実施した。正常マウス6匹に対して400  $\mu$ g/headの3C1E抗体を静脈内投与して、8時間後の血清1,25D濃度を測定した。対照としてPBSを投与して同様に処置したマウスの血清1,25D濃度を測定した。その結果を図21Bに示す。この実験では、3C1E抗体による著しい血清1,25D濃度の上昇が認められた。

## 【0122】

## 【発明の効果】

本発明により、FGF-23に対する抗体が提供される。本発明の抗体は、生体内のFGF-23を適切に検出、測定することにより、FGF-23蛋白質の蓄積又は減少を伴う疾患や病的状態を診断するために有用である。

## 【0123】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING



<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> ANTI FGF-23 ANTIBODY

<130> P01-927

<140>

<141>

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val

1

5

10

15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu

20

25

30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg

35

40

45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala  
 50 55 60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala  
 65 70 75 80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met  
 85 90 95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn  
 100 105 110

Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His  
 115 120 125

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala  
 130 135 140

Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg  
 145 150 155 160

Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg  
 165 170 175

His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val  
 180 185 190

Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln  
 195 200 205

Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu

210

215

220

Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly

225

230

235

240

Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

245

250

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

ccggaattca gccactcaga gcagggcacg

30

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 52

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

ataagaatgc ggccgctcaa tggatgatggat gatgatggat gaacttggcg aa 52

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

ataagaatgc ggccgctcag atgaacttgg cgaa 34

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

ataccacggc agcacaccca gagcgccgag 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

ctcggcgctc tgggtgtgct gccgtggtat

30

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

atgaattcca ccatgttggg ggcccgcctc agg

33

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

atgcggccgc ctaatgatga tgatgatgat ggatgaactt ggcgaagg

49

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 9

Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Cys

1 5 10 15

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 10

Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly

1 5 10 15

Ala Pro His Gln Cys

20

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 11

Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser

1

5

10

15

Pro Gln Tyr His Cys

20

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 12

Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu

1

5

10

15

Cys

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 13

Cys Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg

1

5

10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 14

Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Cys

1

5

10

15



<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 15

Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Cys

1

5

10

15

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 16

Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Cys

1

5

10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 17

Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

1 5 10 15

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 18

Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Cys

1 5 10

<210> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 19

Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val

1

5

10

15

Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys

20

25

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 20

Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu

1

5

10

15

Asn Cys

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 21

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala

1 5 10 15

Phe Leu Pro Gly Met Asn Cys

20

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 22

Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Cys

1 5 10

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 23

Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 24

Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala

1 5 10 15

Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys

20

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25

attagccact cagtgtgtg caatg

25

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 26

gcagcctggc ctggggacct a

21

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 27

ggaattccac catgctaggg acctgcctta gactc

35

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 28

atagtttagc ggccgcctag acgaacctgg gaaaggggCg aca

43

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 29

ttcgcccacg gcaacacacg caaagcgccg aggac

35

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 30

gtcctcggcg ctttgcgtgt gttgccgtgg gcgaa

35

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Arg His Thr Arg

1

【 0 1 2 4 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成DNA

配列番号 4 : 合成DNA

配列番号 5 : 合成DNA

配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

配列番号 8 : 合成DNA

配列番号 9 : 合成ペプチド

配列番号 10 : 合成ペプチド

配列番号 11 : 合成ペプチド

配列番号 12 : 合成ペプチド

配列番号 13 : 合成ペプチド

配列番号 14 : 合成ペプチド



配列番号15：合成ペプチド

配列番号16：合成ペプチド

配列番号17：合成ペプチド

配列番号18：合成ペプチド

配列番号19：合成ペプチド

配列番号20：合成ペプチド

配列番号21：合成ペプチド

配列番号22：合成ペプチド

配列番号23：合成ペプチド

配列番号24：合成ペプチド

配列番号25：合成DNA

配列番号26：合成DNA

配列番号27：合成DNA

配列番号28：合成DNA

配列番号29：合成DNA

配列番号30：合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】

CHO-FGF23H細胞培養上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、抗FGF-23ポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングにより組換え体FGF-23蛋白質およびその代謝物を検出した図である。培養上清中には全長のFGF-23H蛋白質と配列番号1のアミノ酸配列の配列番号179番目と180番目の間で切断された生じたN末側断片とC末側断片が存在する。hFGF23-48抗体および hFGF23-148抗体で、全長のFGF-23H蛋白質とN末側断片ペプチドが認識された。N末側断片は小断片化されたペプチドの存在が認められる。抗His6-tag抗体では、全長蛋白質とC末側断片が検出された。（実施例2）

【図 1 B】

CHO-FGF23細胞培養上清から精製したFGF-23全長蛋白質とN末側断片およびC末側断片をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、CBB染色して検出し

た図である。(実施例2)

【図1C】

CHO-FGF23HとCHO-FGF23RQ細胞培養上清をそれぞれ採取し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、抗FGF23-148抗体でウェスタンブローディングにより組換え体FGF-23蛋白質、組換え体FGF-23RQ蛋白質およびそれらの代謝物を検出した図である。(実施例5)

【図2】

抗FGF-23ポリクローナル抗体であるhFGF23-25抗体を固相化し、検出用抗体としてhFGF23-237抗体を用いたサンドイッチELISAでFGF-23H蛋白質の測定を実施した図である。(実施例7)

【図3】

抗FGF-23モノクローナル抗体でFGF-23H蛋白質を免疫沈降し、それをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、2A2B抗体および1C3H抗体で検出した結果を示す図である。(実施例10)

【図4】

抗FGF-23モノクローナル抗体を固相化し、抗FGF-23ポリクローナル抗体で検出を行うサンドイッチELISAにて精製したFGF-23H全長蛋白質、N末側断片ポリペプチド、C末側断片ポリペプチドを検出した結果を示す図である。(実施例11)

【図5】

FGF-23蛋白質の全長蛋白質とその切断部位および抗FGF-23モノクローナル抗体の認識部位を模式的に表した図である。(実施例12)

【図6】

2C3B抗体を固相化抗体として用い、検出抗体として1C3H抗体、1D6A抗体および3C1E抗体を用いたELISA系で精製したFGF-23蛋白質を定量的に測定した結果を示す図である。(実施例13)

【図7】

CHO-FGF23H細胞を移植したヌードマウスより採取した血清に含まれるFGF-23H蛋白質を1C3H抗体、1D6A抗体、および2C3B抗体を固定化したレジンを用いて免疫沈降法で回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、2A2B抗体

および1C3H抗体で検出した結果を示す図である。(実施例15)

【図 8】

20 ngの精製FGF-23蛋白質にラット血清を終濃度で50%になるように添加して混和し、0、0.5、1、2、4、8、24時間インキュベートすることで生じる代謝物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、2 A2B抗体を用いてウエスタンブロッティングにて検出した結果を示す図である。(実施例16)

【図 9】

20 ngの精製FGF-23蛋白質にヒト血清またはヒト血漿を終濃度50%になるように添加して37℃で3時間インキュベートした後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、2 A2B抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施して、精製FGF-23蛋白質に由来する代謝物を検出した結果を示す図である。(実施例16)

【図 10】

20 ngの精製FGF-23蛋白質にトロンピンを終濃度1 unit/mlで添加し、3時間インキュベートした後、この溶液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、2 A2B抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施し、精製FGF-23蛋白質に由来する代謝物を検出した結果を示す図である。(実施例17)

【図 11】

トロンピン選択的阻害剤であるヒルジンの存在下および非存在下で20 ngの精製したFGF-23蛋白質にラットの血清を終濃度50%になるように添加して4時間インキュベートし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、2 A2B抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施して、精製FGF-23蛋白質に由来する代謝物を検出した結果を示す図である。(実施例17)

【図 12】

10  $\mu$ gの精製FGF-23蛋白質とラットの血清を24時間混和して22kDaのポリペプチドを生成させた。この22 kDaのポリペプチドを抗2A2B抗体カラムで精製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、22kDaポリペプチドをCBB染色で同定したことを示す図である。(実施例18)

【図 13】

2C3B抗体を固相化し3C1E抗体または1D6A抗体で検出するELISA系を用いて、腫瘍性骨軟化症患者の原因腫瘍摘出前後で採取した血液サンプル中のFGF-23蛋白質を測定した結果を示す図である。（実施例19）

【図 1 4】

腫瘍性骨軟化症患者の原因腫瘍摘出前後で採取した血液サンプル中のFGF-23蛋白質を定量化した結果を示す図である。（実施例19）

【図 1 5】

腫瘍性骨軟化症患者より摘出した腫瘍組織中のFGF-23蛋白質の存在を免疫組織染色にて検出した結果を示す図である。（実施例20）

【図 1 6 A】

精製したマウスFGF-23RQ蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、抗ヒトFGF-23モノクローナル抗体である3C1E抗体でウェスタンブロッティングを実施してマウスFGF-23RQ蛋白を検出した結果を示す図である。（実施例21）

【図 1 6 B】

精製したマウスFGF-23蛋白質を段階希釈して、2C3B抗体を固相化し、検出用抗体として3C1E抗体を用いて、マウスFGF-23蛋白質溶液を測定した結果を示す図である。（実施例21）

【図 1 7】

2C3B抗体を固相化し、検出用抗体として3C1E抗体を用いたELISA系を用いて、27～30週齢のHypマウスおよび対照マウスより採取した血清中の内在性のFGF-23蛋白質を測定した結果を示す図である。（実施例23）

【図 1 8 A】

6週齢のBALB/c雄マウス 6 匹に精製したFGF-23H蛋白質を一匹あたり5  $\mu$ g投与し、投与後1, 4, 9時間経過したところで採血し、血清中の1,25D濃度を測定した結果を示す図である。（実施例23）

【図 1 8 B】

7週齢のBALB/c雄マウス 6 匹に0.025  $\mu$ gの1,25Dを腹腔内に投与し、投与後8時間経過したところで採血を行い、血清中のFGF-23量を測定した結果を示した図である。（実施例23）

## 【図 1 9 A】

7週齢のWistarラットに0.75%の割合でアデニンを混餌したCE-2（日本、クレア社）を与え、腎機能不全高リン血症モデルを作製した。対照群には、CE-2を与えた。混餌食を与えて3週間後に採血し血清中のリン酸濃度を測定した結果を示す図である。（実施例24）

## 【図 1 9 B】

7週齢のWistarラットに0.75%の割合でアデニンを混餌したCE-2（日本、クレア社）を与え、腎機能不全高リン血症モデルを作製した。対照群には、CE-2を与えた。混餌食を与えて3週間後に採血したのち、ラットを代謝ケージ入れて尿を24時間採取した。血清中および尿中のクレアチニンの濃度を測定した結果を示す図である。（実施例24）

## 【図 1 9 C】

7週齢のWistarラットに0.75%の割合でアデニンを混餌したCE-2（日本、クレア社）を与え、腎機能不全高リン血症モデルを作製した。対照群には、CE-2を与えた。混餌食を与えて3週間後に採血した。2C3B抗体を固相化し、3C1E抗体を検出抗体としたELISA系を用いて血清中のFGF-23濃度を測定した結果を示す図である。（実施例24）

## 【図 2 0】

腫瘍性骨軟化症患者血漿中に存在するFGF-23蛋白質の免疫沈降法により検出した図である。（実施例25）

## 【図 2 1 A】

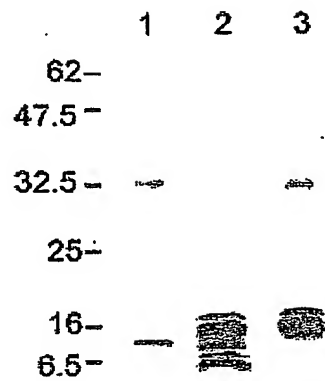
各種モノクローナル抗体および媒体を投与後、24時間目における血清中リン酸、カルシウム、1,25-ジヒドロキシビタミンD濃度を示した図である。（実施例26）

## 【図 2 1 B】

3C1Eモノクローナル抗体および媒体を投与後、8時間目における血清中1,25-ジヒドロキシビタミンD濃度を示した図である。（実施例27）

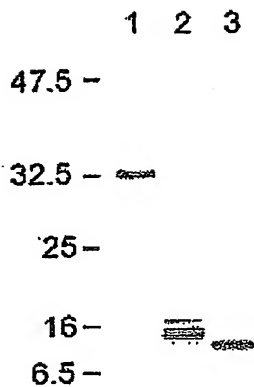
【書類名】 図面

【図 1 A】



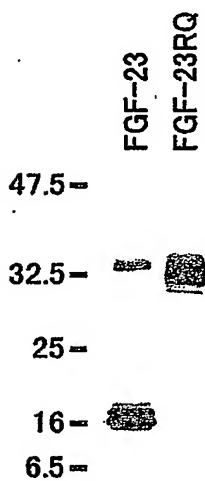
1: 抗His-tag抗体  
2: 抗FGF23-48抗体  
3: 抗FGF23-148抗体

【図 1 B】

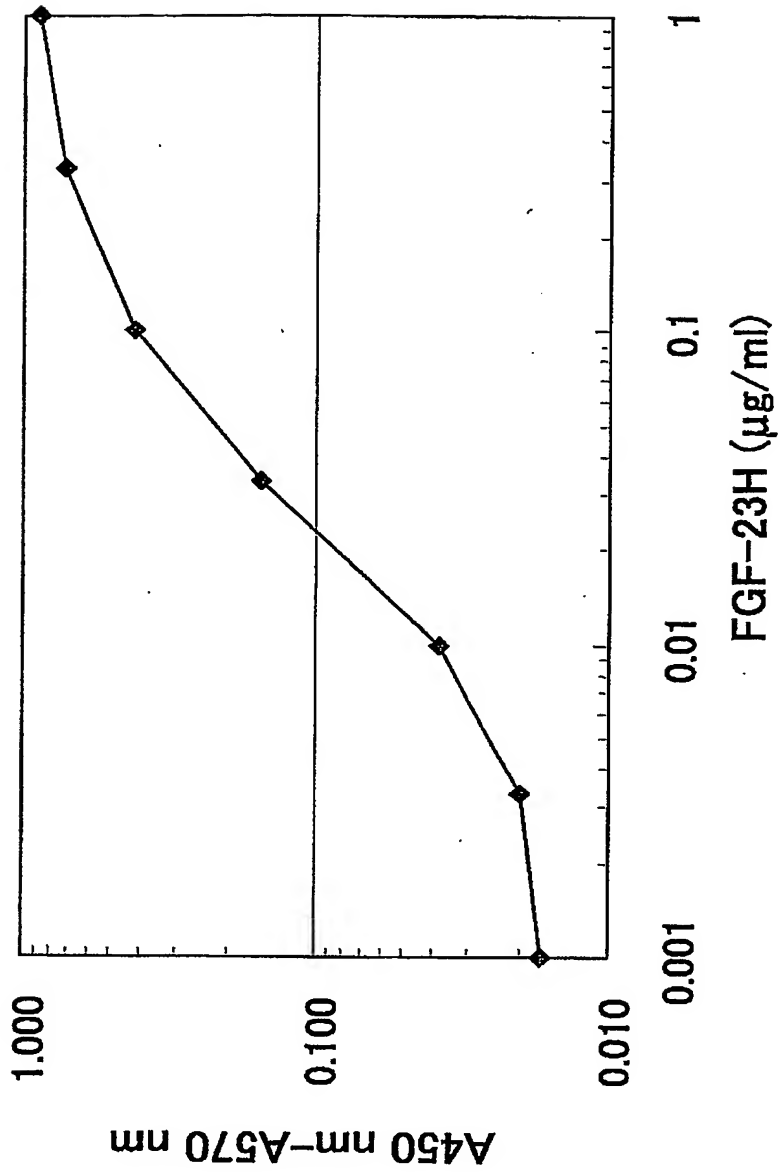


1: 全長FGF-23  
 2: FGF-23断片(N末側)  
 3: FGF-23断片(C末側)

【図 1 C】

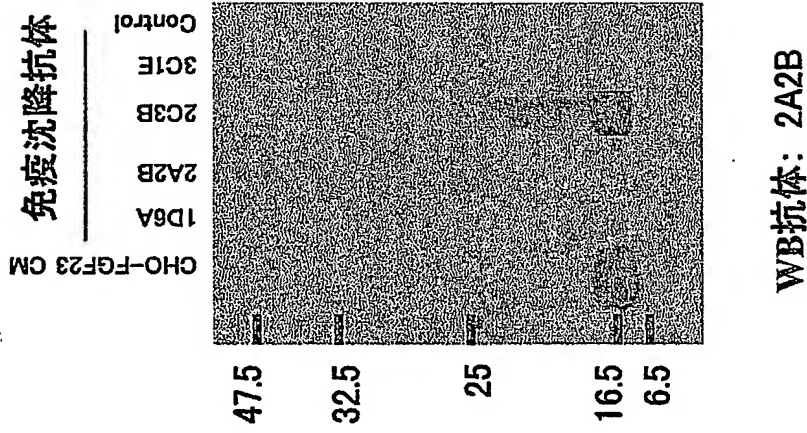
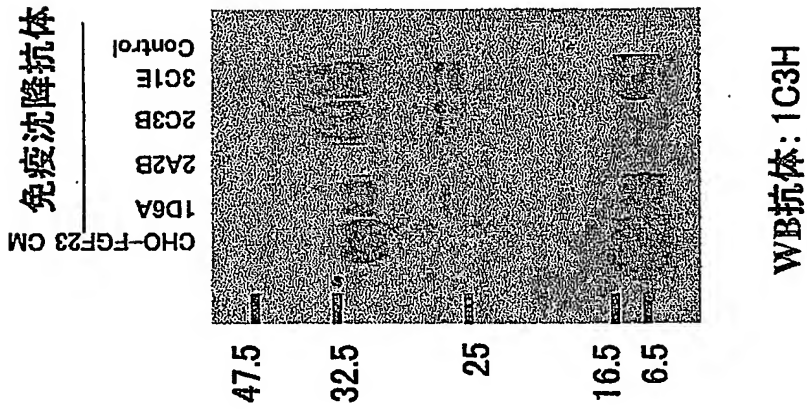


【図 2】

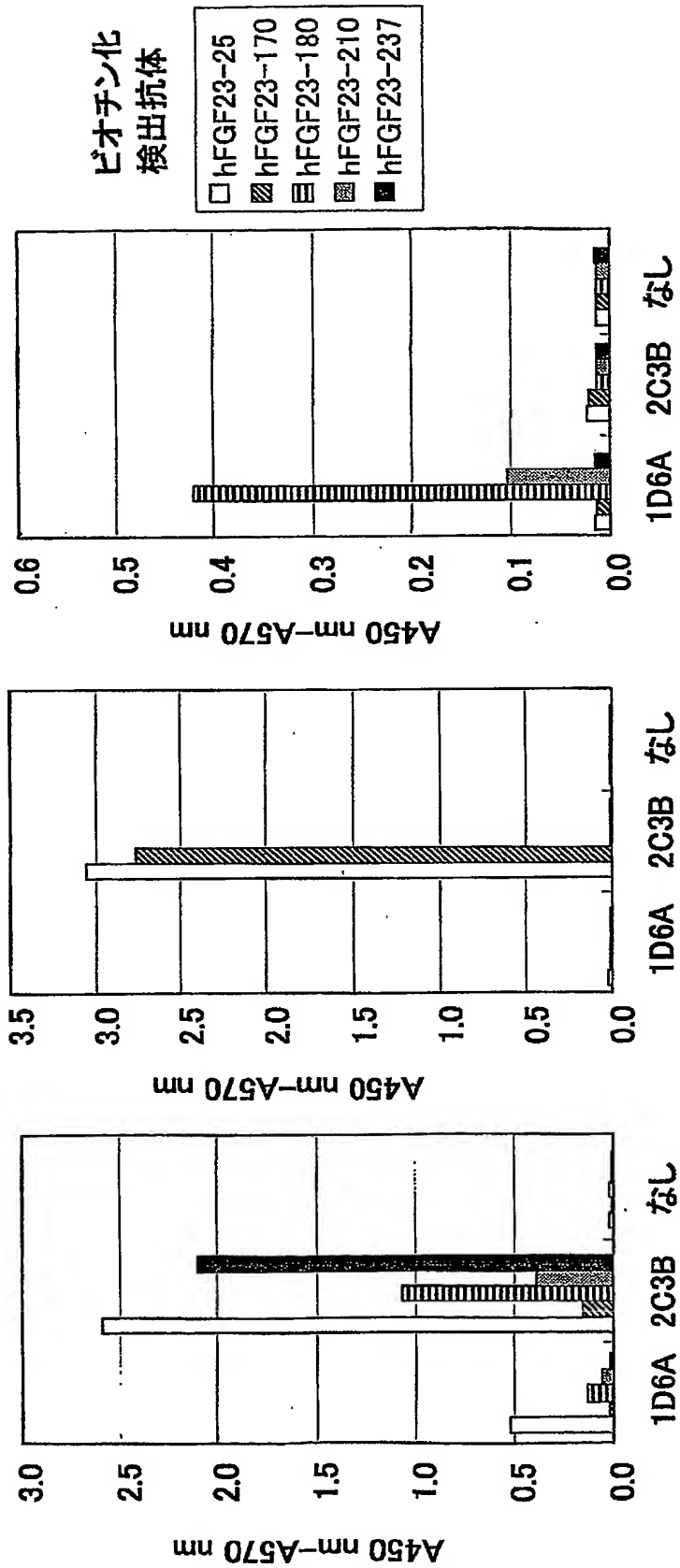




【図 3】

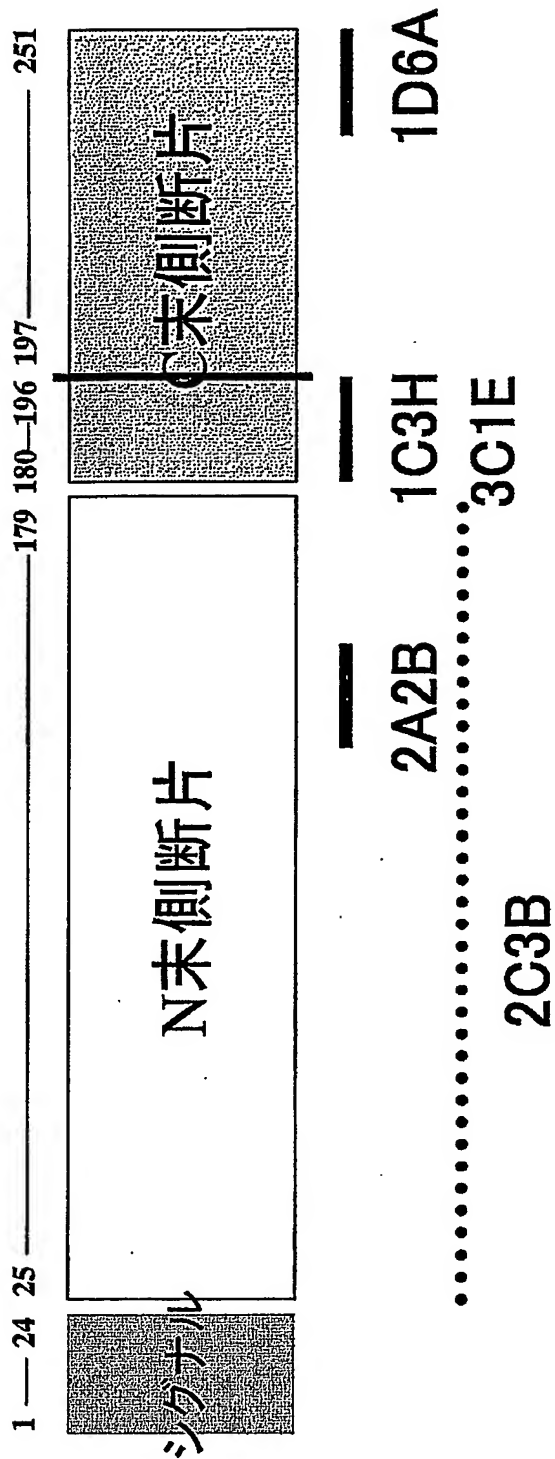


【図 4】

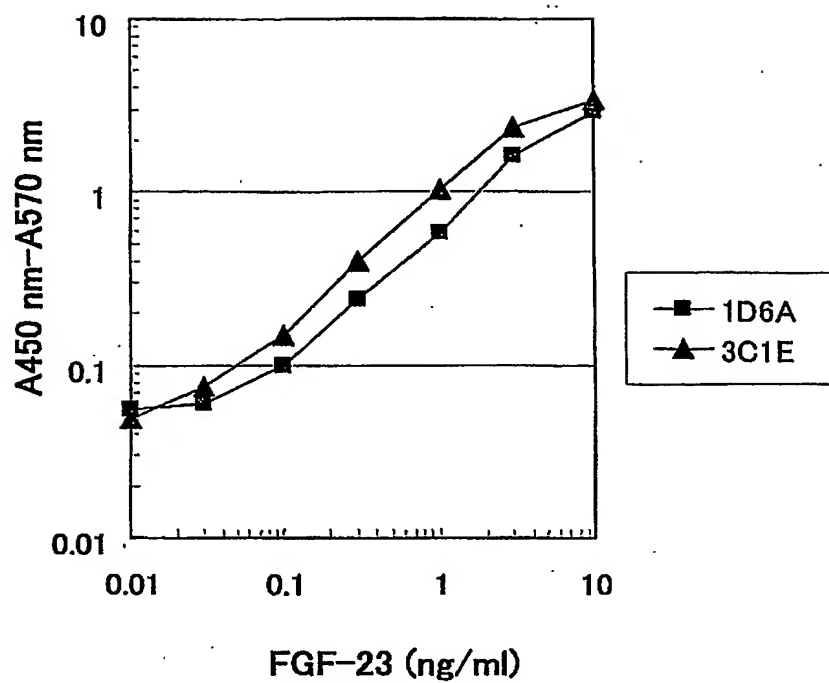


固相化モノクローナル抗体

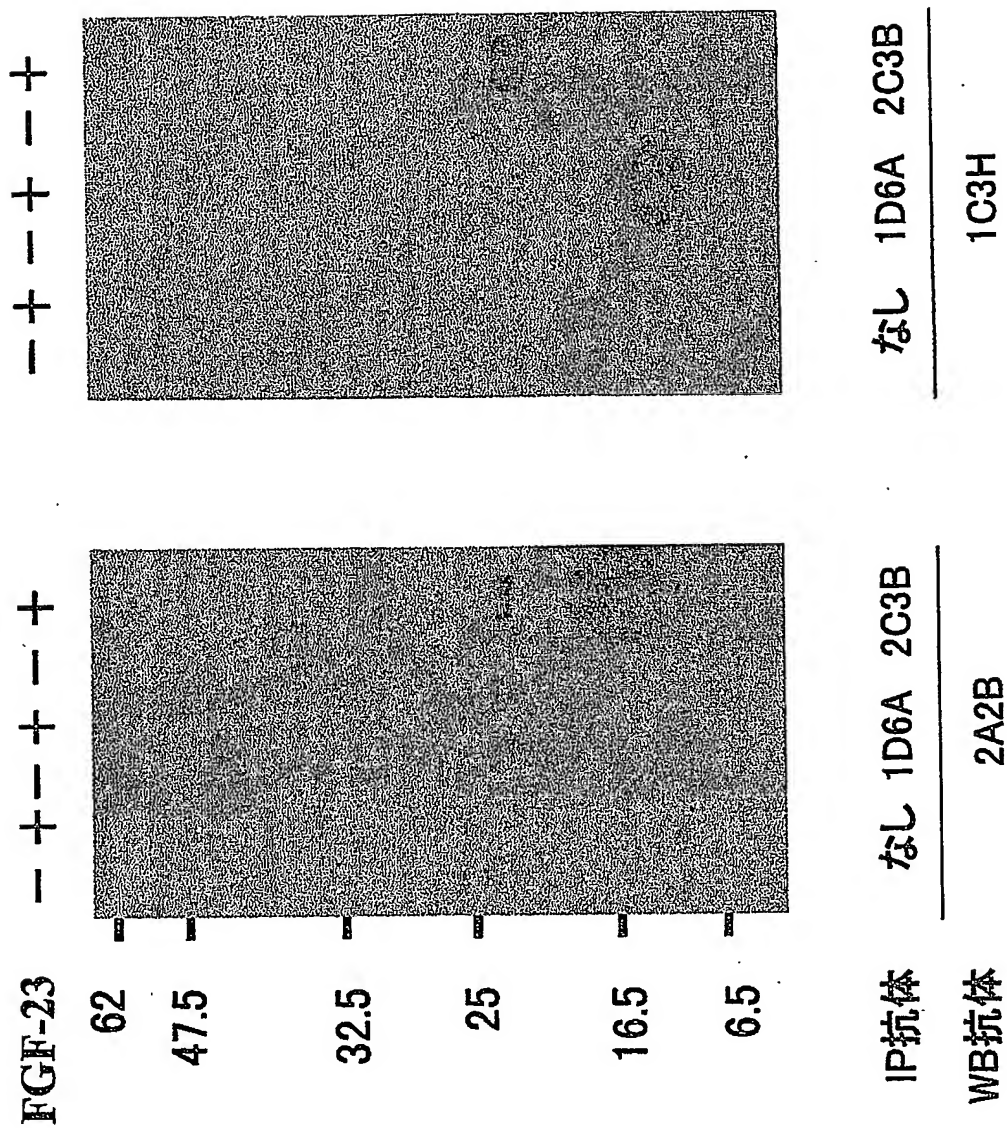
【図 5】



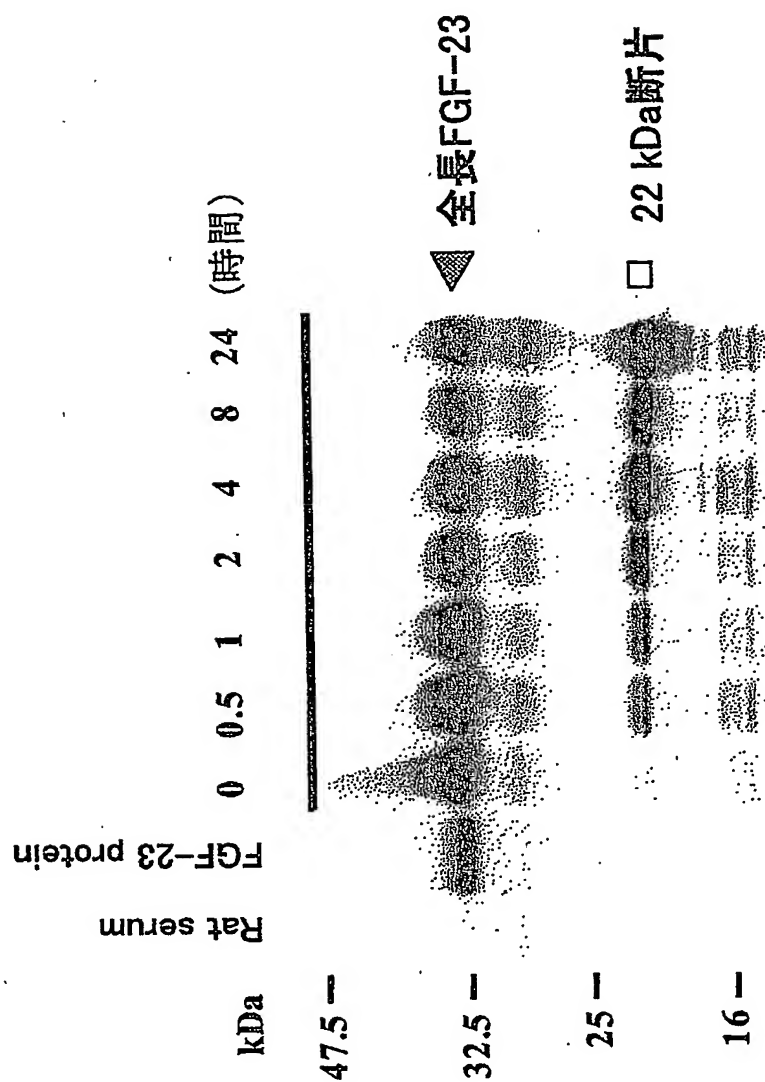
【図 6】



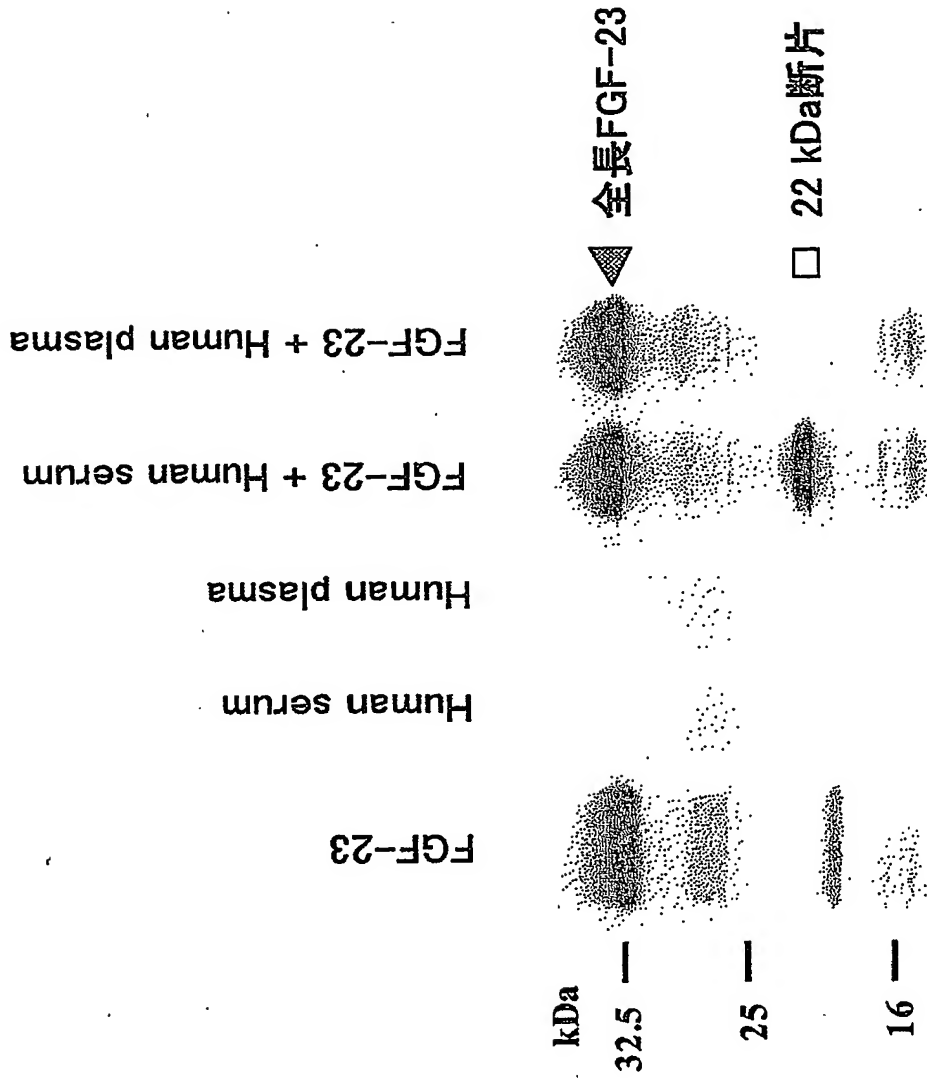
【図7】



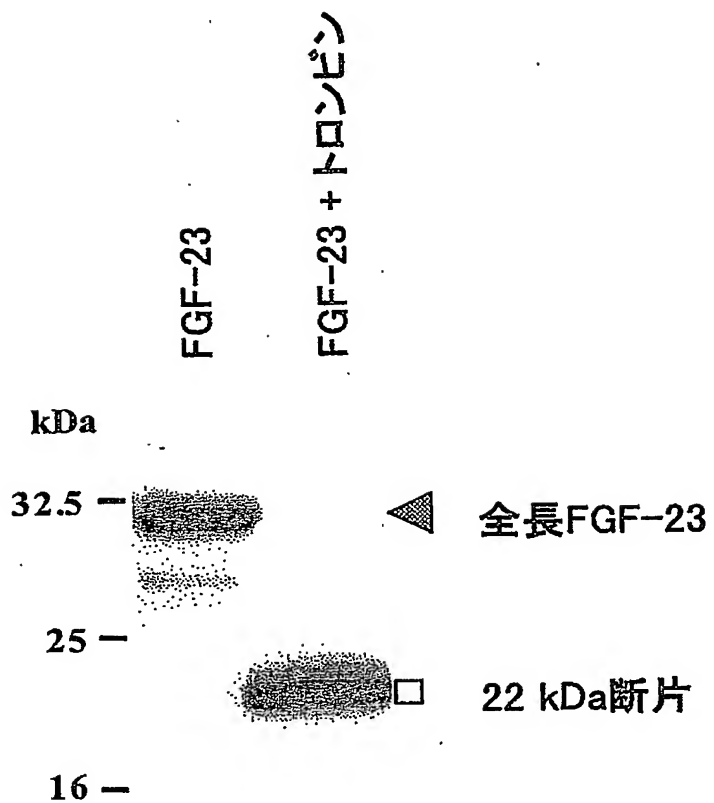
【図 8】



【図 9】

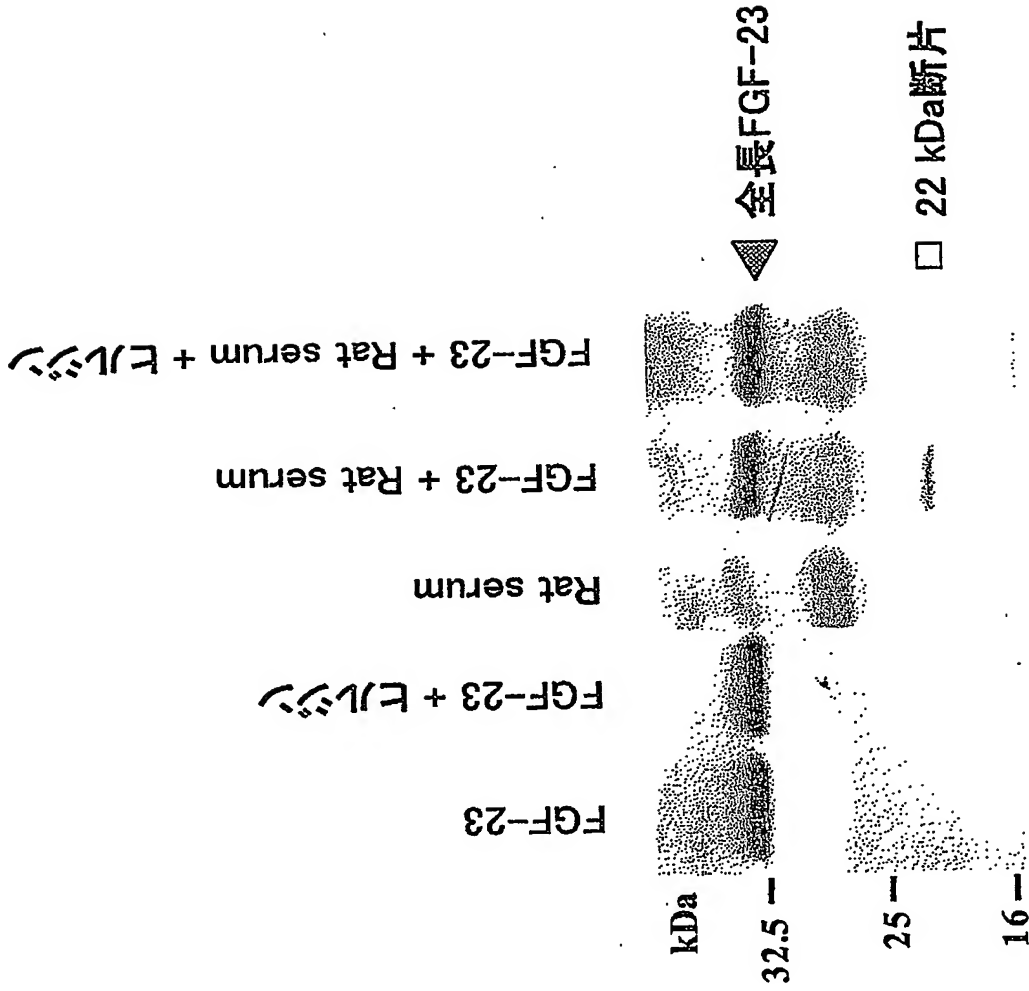


【図 10】

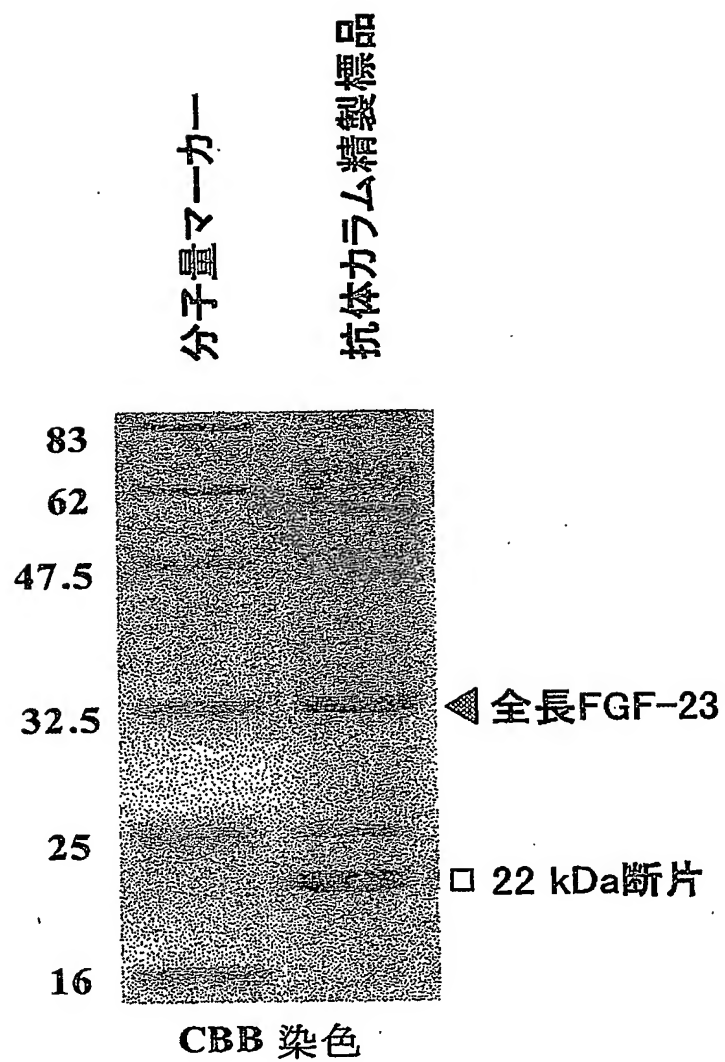




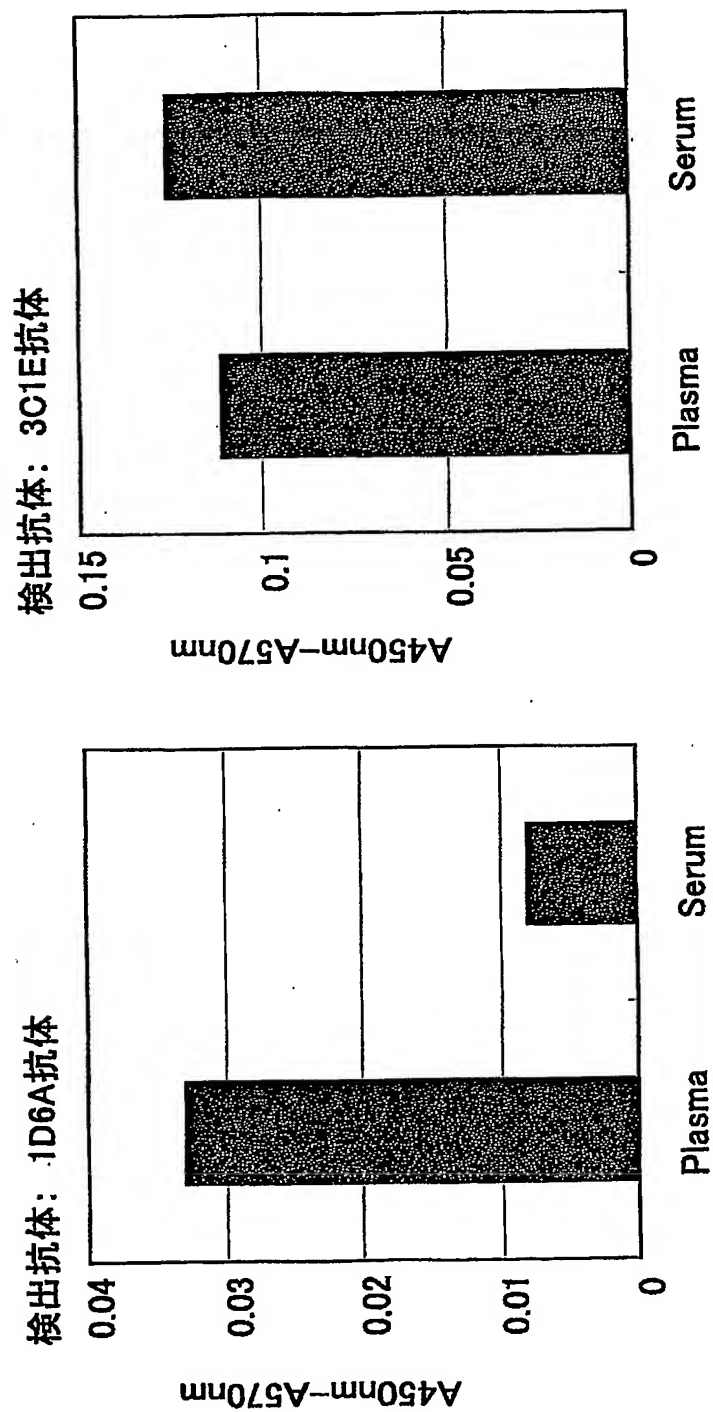
【図 11】



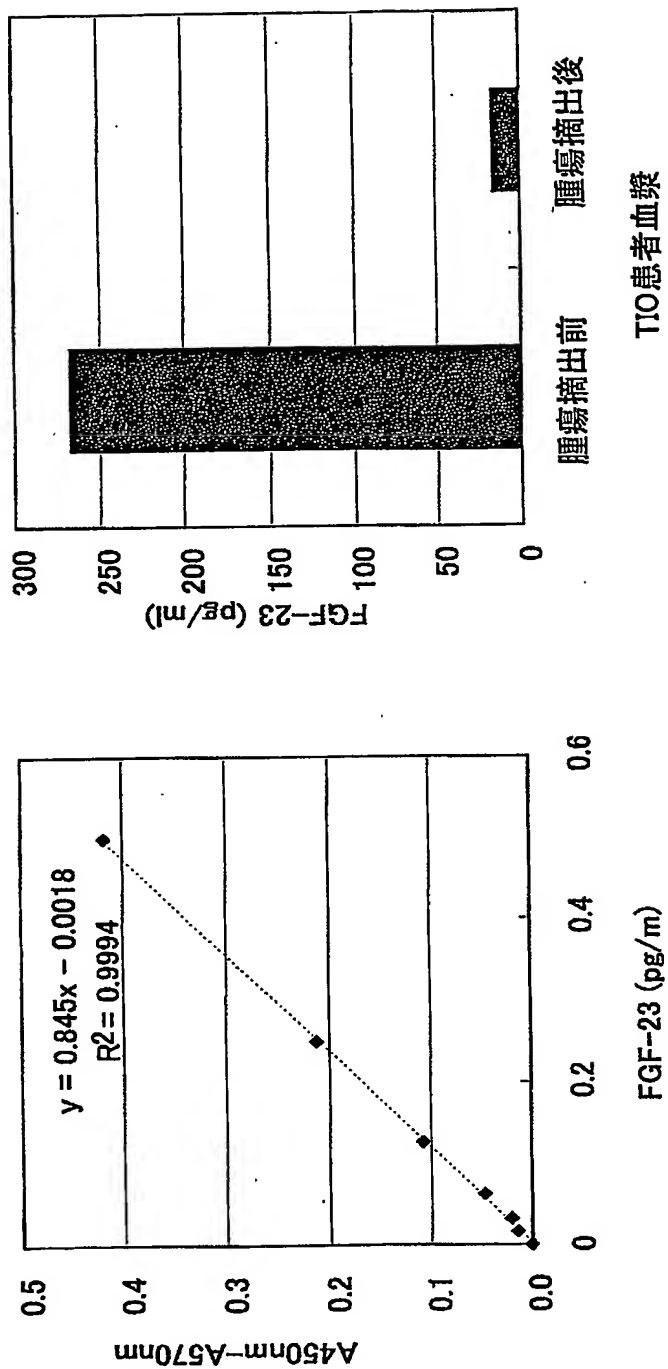
【図 12】



【図 13】



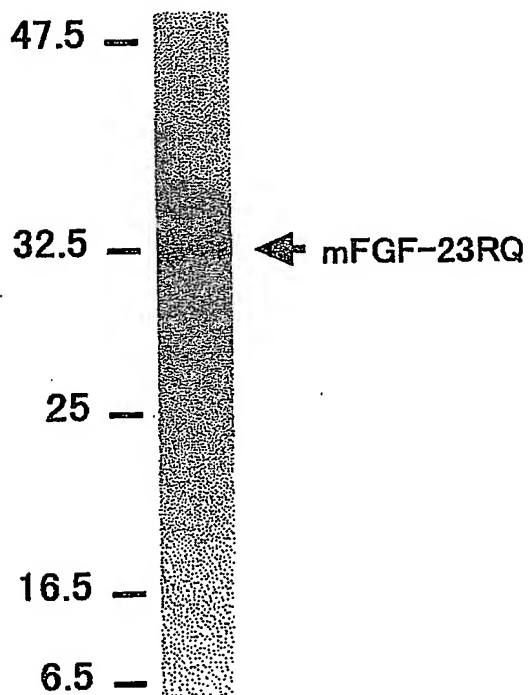
【図14】



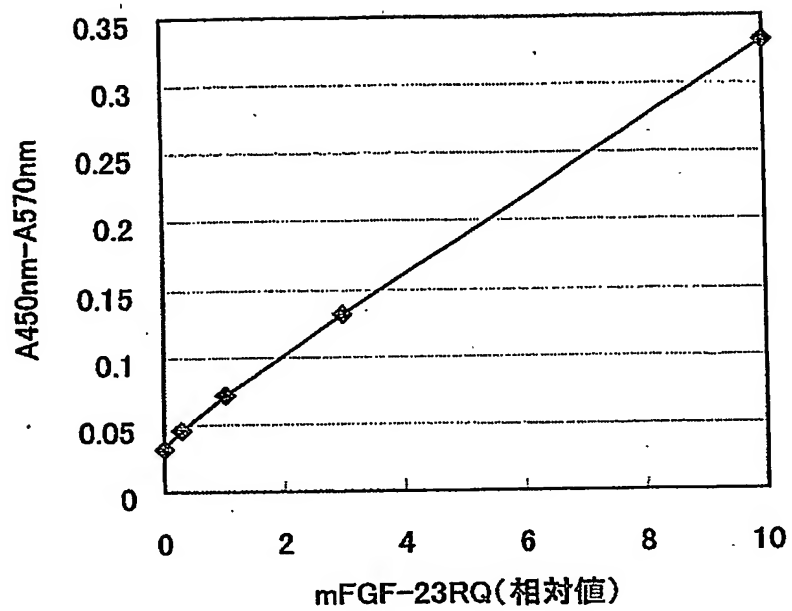
【図15】



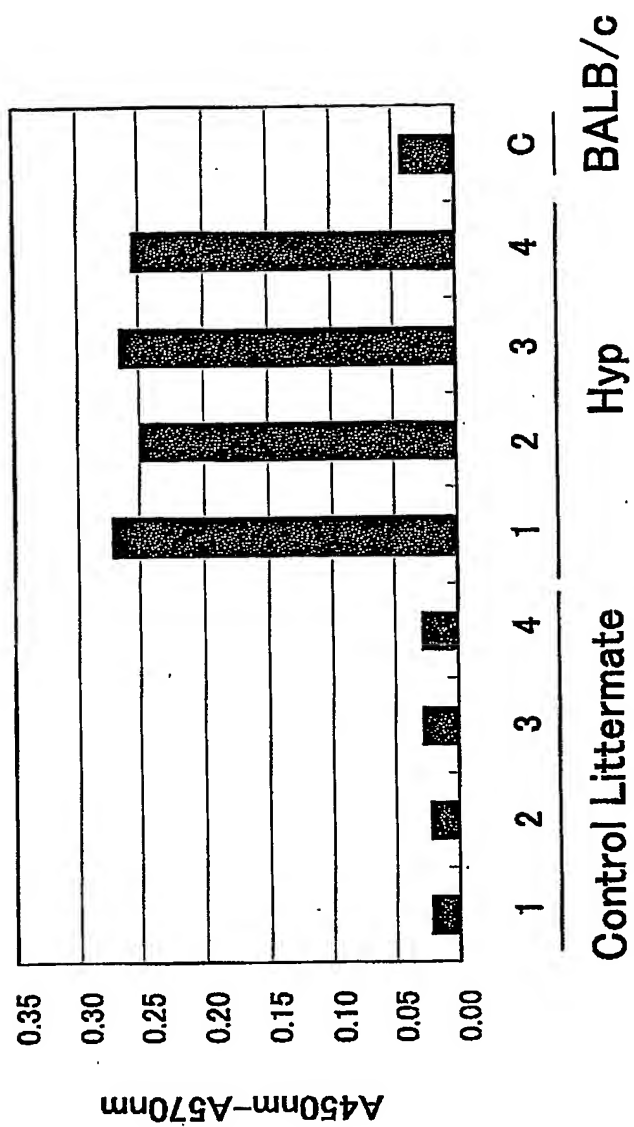
【図16A】



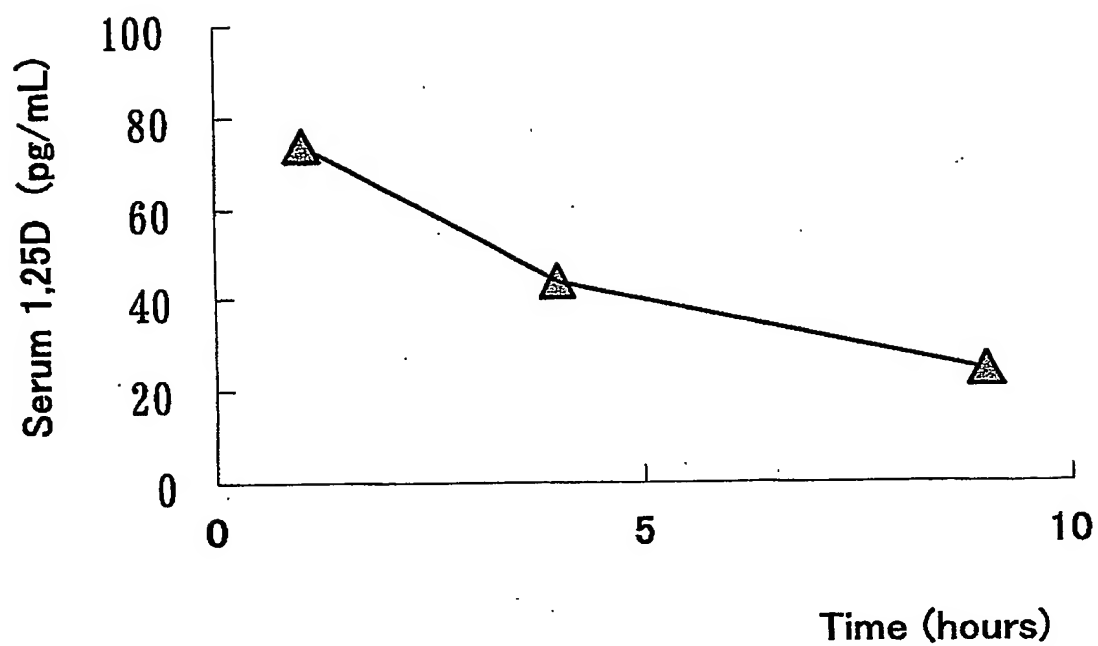
【図16B】



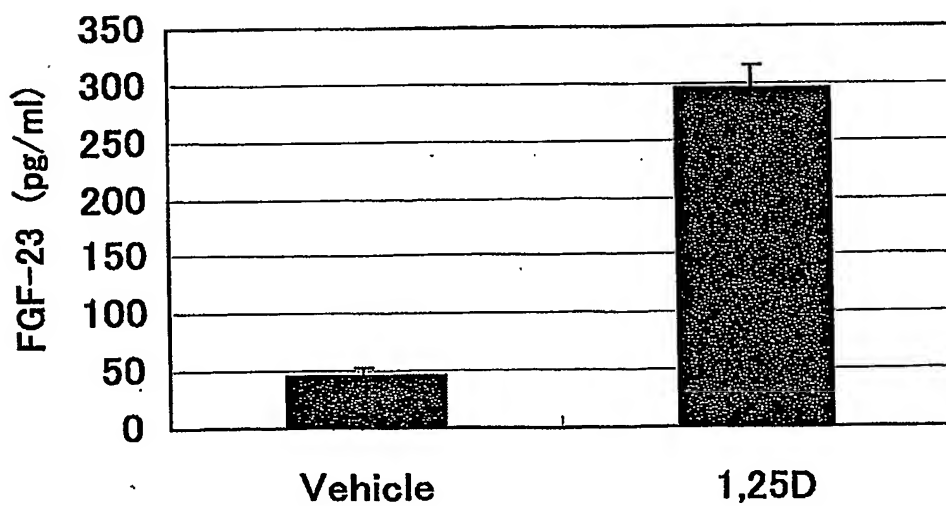
【図 17】



【図 18 A】

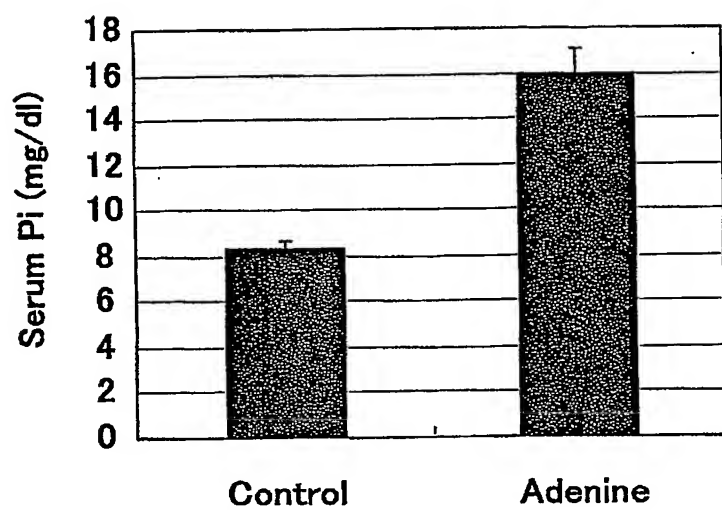


【図 18 B】

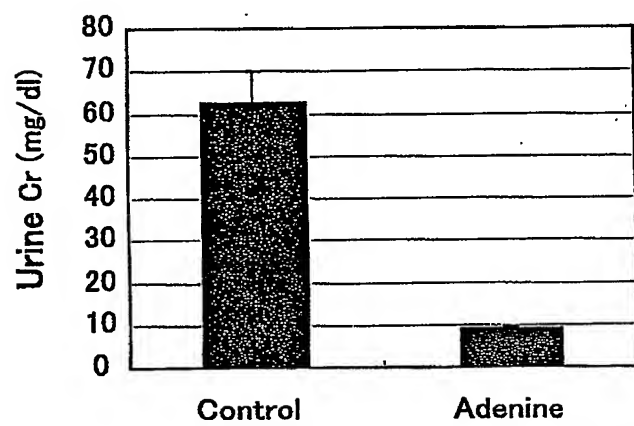
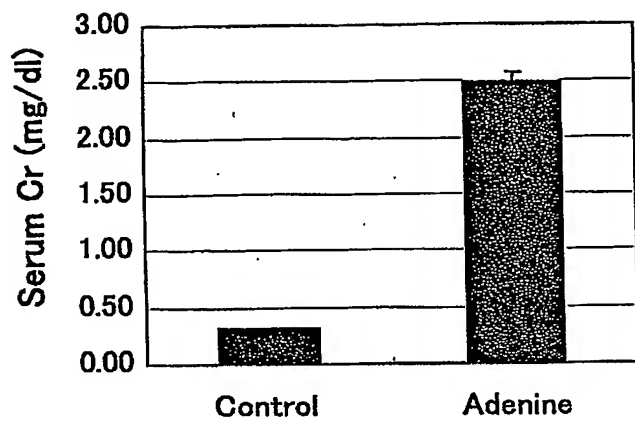




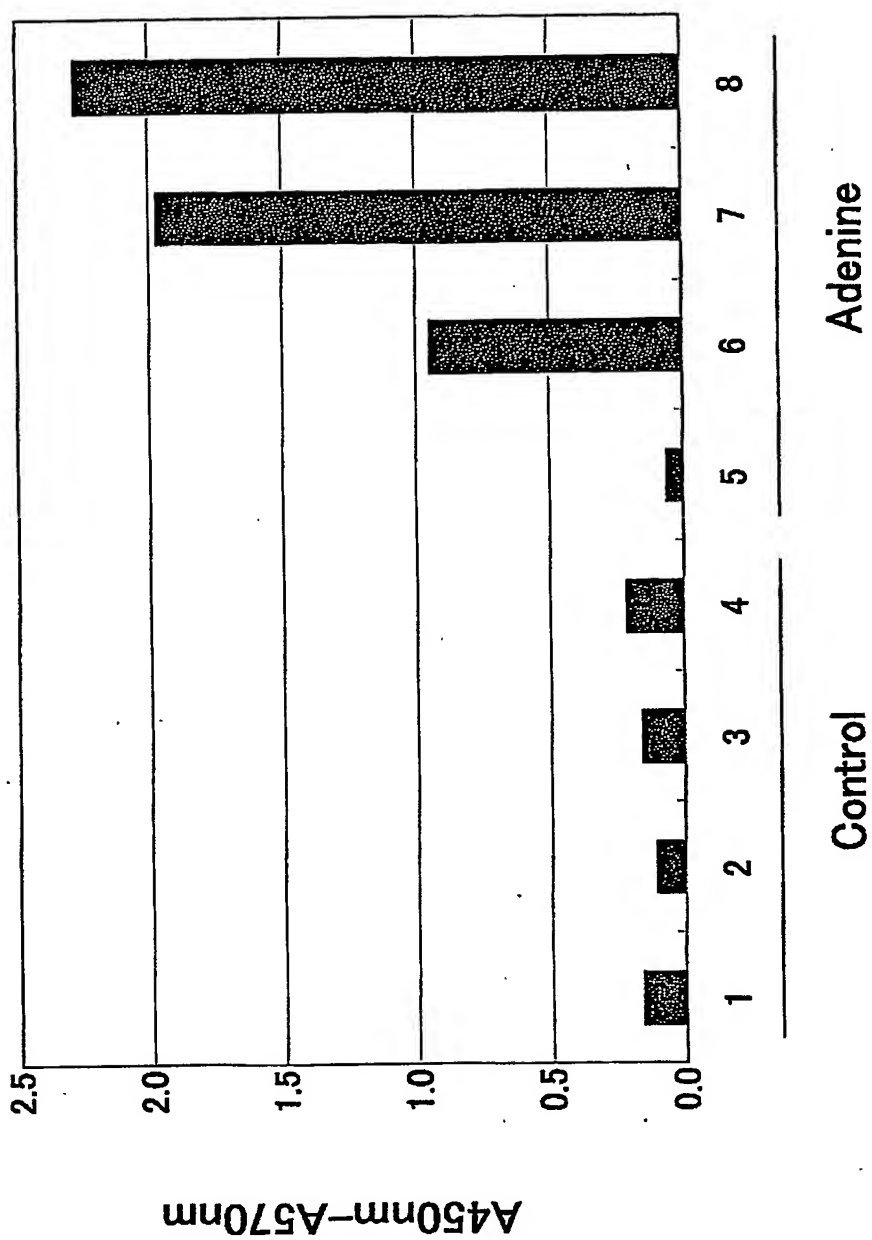
【図 19 A】



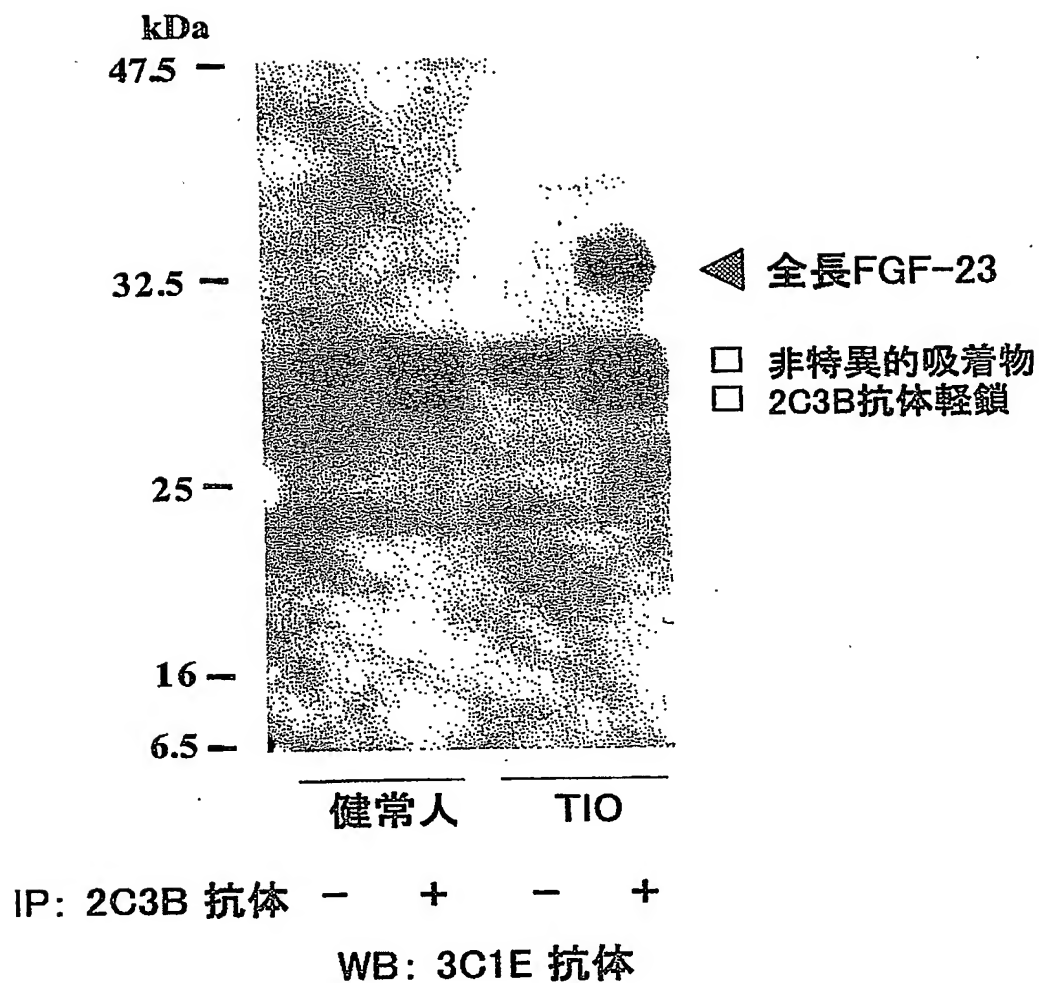
【図 19 B】



【図 19C】



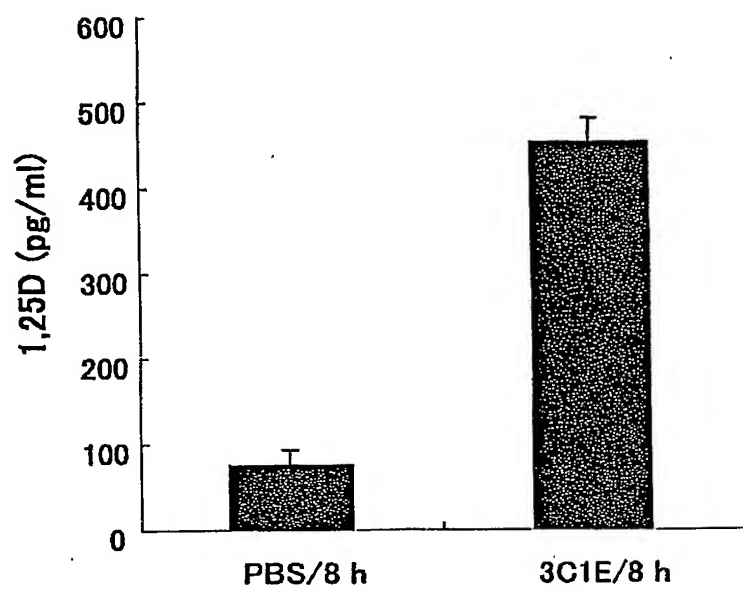
【図 20】



【図 21 A】

群構成	投与物質	例数	リン酸 (mg/dL)	カルシウム (mg/dL)	1, 25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)
第1群:	PBS	4	8.95 +/- 0.31	9.41 +/- 0.20	118.1 +/- 8.1
第2群:	1D6A	4	6.65 +/- 0.47 *	9.50 +/- 0.17	84.0 +/- 2.6 *
第3群:	2C3B	4	10.73 +/- 1.22	9.74 +/- 0.14	192.5 +/- 3.9 *
第4群:	3C1E	4	11.76 +/- 0.42 *	9.49 +/- 0.04	78.5 +/- 2.2 *
第5群:	抗TP0抗体	4	8.93 +/- 0.41	9.41 +/- 0.08	147.9 +/- 3.8 *

【図 21 B】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 線維芽細胞増殖因子-23に対する抗体の提供。

【解決手段】 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線維芽細胞増殖因子-23活性を有するポリペプチドを動物に免疫することによって得られ、リン酸代謝又はビタミンD代謝調節活性を有する抗体であって、以下の(a)、(b)又は(c)で示される抗体。

(a) 配列番号1に示す第180番目～第194番目若しくは第237番目～第251番目のアミノ酸配列を認識する抗体

(b) 受託番号がFERM BP-7838、FERM BP-7839若しくはFERM BP-7840であるハイブリドーマが生産する抗体

(c) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとの結合において、受託番号がFERM BP-7838、FERM BP-7839若しくはFERM BP-7840であるハイブリドーマが生産する抗体と競合する抗体

【選択図】 図5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000253503]

1. 変更年月日	1995年 6月14日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区新川二丁目10番1号
氏 名	麒麟麦酒株式会社



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**